

# BEEINFLUSSUNG DER RENIN-INDUZIERTEN HYPERTROPHEN KARDIOMYOPHATHIE SOWIE DER AKTIVIERUNG VON MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEINKINASEN DURCH ATORVASTATIN

**ANDREA LINK**

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
Professur für Schweinekrankheiten  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner  
und

dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik III für Innere Medizin  
Betreuer: Prof. Dr. med. Markus Flesch

**Beeinflussung der  
Renin-induzierten hypertrophen Kardiomyopathie  
sowie der Aktivierung von  
Mitogen-aktivierten Proteinkinasen  
durch Atorvastatin**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Andrea Link**

Tierärztin aus Lüdenscheid

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. med. vet. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. agr. Gerald Reiner  
Prof. Dr. med. Markus Flesch

Tag der Disputation: 06. Juli 2009

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Druckinduzierte Myokardhypertrophie .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Kalzium-Homöostase .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. HMGCoA-Reduktasehemmer .....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Cholesterin-unabhängige Effekte von HMGCoA-Reduktasehemmern .....	13
1.4.2. HMGCoA-Reduktasehemmer und Myokardhypertrophie .....	15
<b>1.5. Fragestellung .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Antikörper, Materialien und Geräte .....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Antikörper.....	18
2.1.2. Materialien für die Tierversuche.....	18
2.1.3. Materialien für die Proteinisolation (Gewebeproben) .....	19
2.1.4. Materialien für die Durchführung der Western-Blots .....	19
2.1.5. Materialien für die Zellkultur und Aufbereitung der Zellen sowie Überprüfung des Fibroblasten-Anteils.....	20
2.1.6. Geräte .....	22
<b>2.2. Tiermodell.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3. Magnetresonanztomographische Untersuchungen am Rattenherzen .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. Untersuchung der kontraktilen Funktion der Rattenherzen in vivo mittels Millar- Katheter.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Gewebegewinnung .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Bestimmung des myokardialen Kollagengehaltes .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7. Proteinisolation .....</b>	<b>27</b>
<b>2.8. Immunochemische Proteinquantifizierung mittels Western-Blot .....</b>	<b>28</b>
<b>2.9. Isolation und Kultivierung von neonatalen Herzmuskelzellen .....</b>	<b>32</b>
<b>2.10. Ermittlung des Gehaltes an Fibroblasten in der Herzmuskelzellkultur mittels Immunhistologie .....</b>	<b>34</b>
<b>2.11. Stimulation der Zellen und Proteinisolation aus den Zellkultur-Proben .....</b>	<b>36</b>
<b>2.12. Statistik .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Effekte von HMGCoA-Reduktasehemmern auf den kardialen Phänotyp .....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Körpergewicht und Herzgewicht .....	38
3.1.2. Magnetresonanztomographische Untersuchungsbefunde.....	40
3.1.3. Myokardialer Kollagengehalt.....	43

<b>3.2. Millar-Katheter-Messungen .....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Blutdruck und Herzfrequenz .....	44
3.2.2. Linksventrikuläre kontraktile Funktion .....	45
<b>3.3. Kalzium-Homöostase regulierende Proteine.....</b>	<b>47</b>
3.3.1. Sarko(endo)plasmatische-Retikulum-Ca <sup>2+</sup> -ATPase .....	47
3.3.2. Phospholamban .....	48
<b>3.4. In-Vivo-Untersuchung des Einflusses von Atorvastatin auf die</b>	
<b>Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38 .....</b>	<b>49</b>
3.4.1. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 .....	50
3.4.2. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 .....	51
<b>3.5. In-Vitro-Untersuchung des Einflusses von Atorvastatin auf die</b>	
<b>Phosphorylierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. Effekte von HMGCoA-Reduktasehemmern auf den kardialen Phänotyp .....</b>	<b>58</b>
4.1.1. Körpergewicht, linksventrikuläres Gewicht bzw. linksventrikuläre Masse .....	58
4.1.2. Enddiastolische linksventrikuläre Wanddicke sowie linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und linksventrikuläres enddiastolisches Volumen....	64
4.1.3. Myokardfibrose .....	67
<b>4.2. Leistung des Herzens .....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Schlagvolumen .....	69
4.2.2. Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit.....	73
4.2.3. Blutdruck .....	76
4.2.4. Herzfrequenz .....	79
<b>4.3. Resultate auf molekularer Ebene .....</b>	<b>79</b>
4.3.1. Kalzium-Homöostase regulierende Proteine Sarko(endo)plasmatische- Retikulum-Ca <sup>2+</sup> -ATPase und Phospholamban .....	79
4.3.2. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38.....	83
<b>4.4. Ergebnisse von In-Vitro-Untersuchungen .....</b>	<b>87</b>
4.4.1. Einfluss von Angiotensin II und Tumornekrosefaktor $\alpha$ auf die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38 .....	87
4.4.2. Einfluss von HMGCoA-Reduktasehemmern auf die Phosphorylierung der Mitogen- aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38 sowie auf Apoptose .....	88
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>94</b>
<b>7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>95</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9. Erklärung .....</b>	<b>125</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>126</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Druckinduzierte Myokardhypertrophie

Die arterielle Hypertonie ist neben der koronaren Herzkrankheit eine der bedeutendsten Risikofaktoren für die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz (Kannel et al., 1994). In der Framingham-Herzstudie zeigte sich, dass rund 75% der Fälle von chronischer Herzinsuffizienz mit Hypertonie allein oder mit Hypertonie in Verbindung mit einem anderen Risikofaktor assoziiert sind (Kannel et al., 1994; Ho et al., 1993). Bluthochdruck erhöht das Risiko eine chronische Herzinsuffizienz zu entwickeln um das dreifache (Kannel et al., 1994). Patienten, deren chronische Herzinsuffizienz auf ihre Hypertonie zurückzuführen ist, haben in der Regel höhere systolische und diastolische Blutdruckwerte als Personen mit Hypertonie, deren Ursache für die chronische Herzinsuffizienz z.B. koronare Herzkrankheit oder ein Defekt an den Herzklappen ist (Ho et al., 1993). Das Vorkommen von chronischer Herzinsuffizienz steigt mit der Schwere der Hypertonie an (Kannel et al., 1994). Die arterielle Hypertonie ist für 39% der Herzinsuffizienzfälle bei Männern und für 59% der Fälle bei Frauen verantwortlich (Levy et al., 1996).

Rund 18% der Fälle von chronischer Herzinsuffizienz konnten in der Framingham-Studie mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels assoziiert werden (Kannel et al., 1994; Ho et al., 1993). Die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie erhöht das Risiko, eine chronische Herzinsuffizienz zu entwickeln enorm (Kannel et al., 1994). Eine vermehrte Druck- oder Volumenbelastung kann Ursache für eine Hypertrophie des Herzens sein (Mondry et al., 1995; Cooper, 1987). Beobachtungen der Framingham-Studie zeigen, dass Patienten mit einer echokardiographisch nachgewiesenen Hypertrophie des linken Ventrikels (LVH) höhere systolische Blutdruckwerte aufweisen als Personen ohne LVH (Savage et al., 1987). Umgekehrt konnte bei einer Untersuchung an spontan hypertensiven Katzen eine statistisch signifikante Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels und des interventrikulären Septums sowie ein verkleinerter enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser nachgewiesen werden (Chetboul et al., 2003). Zunächst ist die Hypertrophie als Anpassung an die Überlastung sinnvoll, da sie die Anzahl der kontraktilen Einheiten erhöht und nach dem Gesetz von Laplace die Spannung der



Ventrikelwand auf normale Level reduziert (Ruwhof und van der Laarse, 2000; Mondry und Swynghedauw, 1995). Es stellen sich dann aber auch Veränderungen der systolischen und diastolischen Funktion (Fox, 2003; Mondry und Swynghedauw, 1995) und Arrhythmien ein (Mondry und Swynghedauw, 1995). In der Diastole zeigen sich Abnormalitäten bei der Relaxation und eine passive Steife der Ventrikel (Widge, 1987). Je ausgeprägter eine Hypertrophie ist, desto höher ist das Risiko der Patienten, eine kontraktile Dysfunktion oder Arrhythmien zu entwickeln sowie an plötzlichem Herztod zu sterben (Widge, 1987). Die Ausbildung einer Fibrose scheint eines der Merkmale zu sein, die den Übergang einer adaptiven in eine maladaptive Hypertrophie kennzeichnen (Pacifico und Henry, 2003).

Eine gesteigerte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) spielt bei der Entstehung einer druckinduzierten Myokardhypertrophie eine wesentliche Rolle (Dahlöf, 1995). So konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung des Angiotensinkonversionsenzym (ACE) nicht nur eine Hypertrophie generell vermindert wird – wie z.B. in einer klinischen Multicenter-Studie an feline Patienten mit einer hypertrophen Kardiomyopathie belegt wurde (Amberger et al., 1999) – sondern durch ACE-Hemmung oder Blockade des Angiotensinrezeptors Subtyp 1 (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) dieser Effekt auch erzielt wird, wenn die Myokardhypertrophie definitiv durch Druck- oder Volumenbelastung induziert wird (Baker et al., 1990; Kojima et al., 1994). Auch an Menschen mit arterieller Hypertonie konnte dies gezeigt werden (Mitsunami et al., 1998). Umgekehrt führt eine zyklische Dehnung von Kardiomyozyten *in vitro* zu einer Aktivierung des RAS und über Bindung von Angiotensin II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) (Yamazaki et al., 1995).

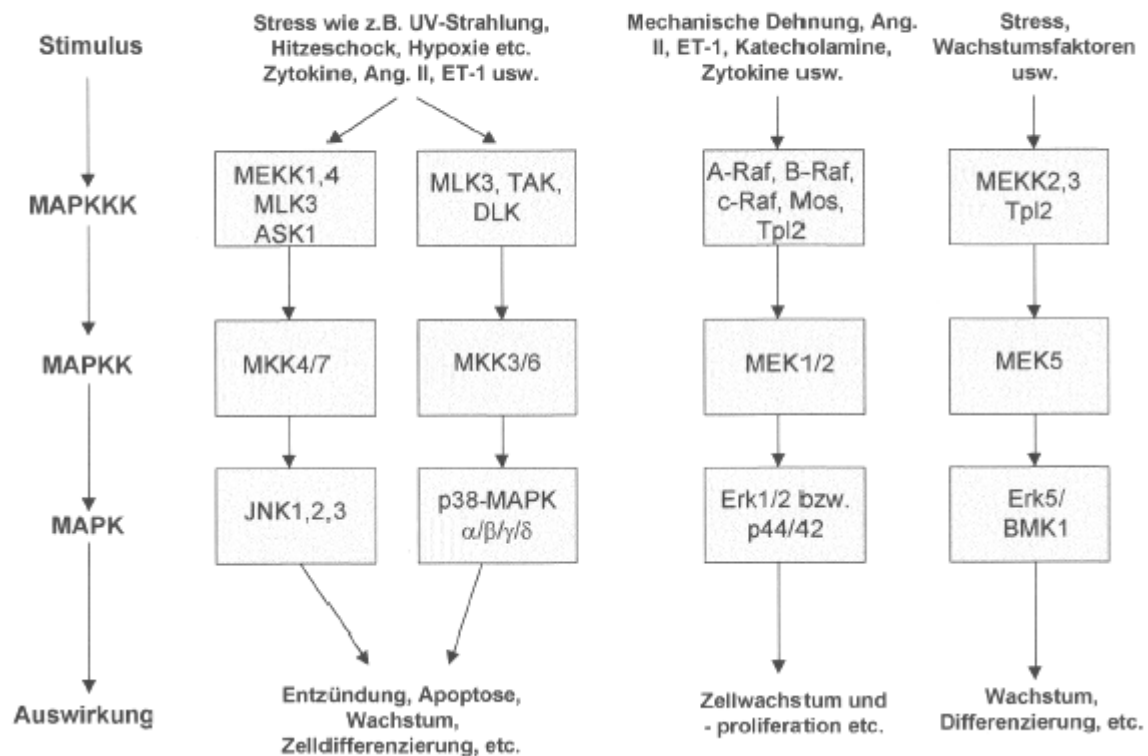
Für langfristige Umbauprozesse am Herzen und an Blutgefäßen sowie auch an der Niere scheint das gewebeständige RAS eine größere Rolle zu spielen als das zirkulierende (Weir und Dzau, 1999), wobei beide aber auch miteinander interagieren (Danser et al., 1994; Danser et al., 1997; Katz et al., 1997). Beim zirkulierenden RAS wird Angiotensinogen in der Leber gebildet. Renin, das von der Niere freigesetzt wird, bewirkt eine Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I) (Page et al., 1943). Ang I wiederum wird durch das ACE und andere Enzyme wie Chymase (Urata et al., 1990), Tonin (Ikeda et al., 1988),

Kathepsin D (Katwa et al., 1997) und G (Klickstein et al., 1982) zu Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Ang II bewirkt zum einen über direkte Wirkung unter anderem Auslösung von Durstgefühl im Gehirn und über eine Vasokonstriktion einen Anstieg des peripheren Gefäßwiderstands, zum anderen mittels Aldosteron-Ausschüttung eine Retention von Wasser und Natrium in der Niere. Diese Vorgänge lassen den Blutdruck ansteigen. In den Zielorganen bindet Ang II an spezifische Rezeptoren, von denen es mehrere Subtypen gibt. Der AT<sub>1</sub>- und der AT<sub>2</sub>-Rezeptor sind die am besten charakterisierten Subtypen. Im menschlichen Herzen werden beide Rezeptor-Typen exprimiert (Wharton et al., 1998). Über eine Bindung an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor werden unter anderem hypertrophe Stimuli vermittelt (Booz et al., 1996). Es wird die Phospholipase C aktiviert, wodurch wiederum die Proteinkinase C aktiviert und Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird (Thomas et al., 1996). Desweiteren führt eine Bindung an diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor unter anderem zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Thomas et al., 1996). Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt antiproliferative, myokardialen Umbauprozessen entgegenwirkende Signale (Isbell et al., 2007; Booz et al., 1996).

## **1.2. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen**

Wie bereits oben erwähnt, kann Ang II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor eine Aktivierung der MAP-Kinasen hervorrufen (Thomas et al., 1996). Die Aktivierung durch diverse Stimuli läuft bei den verschiedenen MAP-Kinasen nach demselben Prinzip in einer Kaskade ab: MAP-Kinasekinasen binden Phosphatgruppen an Serin- und Threonin-Reste von MAP-Kinasekinasen, die dadurch aktiviert werden. Diese wiederum phosphorylieren – und aktivieren dadurch – die MAP-Kinasen an einem Tyrosin- und einem Threonin-Rest, die durch eine weitere Aminosäure getrennt sind. Die MAP-Kinasen können im aktivierten Zustand andere Proteine wie z.B. diverse Transkriptionsfaktoren an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren (Pearson et al., 2001).

## Mitogen-aktivierte Protein-Signalkaskaden



**Abbildung 1:** Mitogen-aktivierte Protein-Signalkaskaden

Bei den MAP-Kinasen werden drei Gruppen unterschieden: die c-JUN N-terminalen Kinasen (JNKs), die p38-Kinasen und die extrazellulär responsiven Kinasen (ERK) (Qi et al., 2007). Die für ERK 5 ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung BMK 1 steht für „big mitogen activated kinase 1“. ERK 1 und ERK 2 sind auch unter dem Namen p42 und p44 bekannt. Diese sind zu 84% identisch aufgebaut (Lefloch et al., 2008). Die Namen p38 und p44/42 leiten sich von dem Molekulargewicht von 38 kDa resp. 44 und 42 kDa ab.

JNKs und p38 zählen zu den sogenannten Stress-aktivierten Proteinkinasen. JNKs werden unter anderem durch Reize wie UV-Strahlung oder Hitzeschock aktiviert. In kultivierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass sie auch durch Hyperosmose (Sugden und Clerk, 1998), reaktionsfähigen Sauerstoff (Sugden und Clerk, 1998; Sugden, 2001; Clerk et al., 1998) und Hypoxie/Reoxygenierung (Sugden und Clerk, 1998) bzw. Ischämie/Reperfusion (Bogoyevitch et al., 1996; Clerk et al., 1998) aktiviert werden. Auch niedrig dosiertes Anisomycin, ein

Proteinsyntheseinhibitor, kann eine Phosphorylierung von JNKs bewirken (Bogoyevitch et al., 1995). Desweiteren aktivieren auch proinflammatorische Zytokine – Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) – JNKs (Sugden und Clerk, 1998). Phenylephrin (Bogoyevitch et al., 1995; Sugden, 2001), das bereits genannte Ang II (Hayashida et al., 2001), Noradrenalin (Ito et al., 2004) und Endothelin-1 (Sugden, 2001) zeigen dieselbe Wirkung.

Von der p38 MAP-Kinase-Familie sind die vier Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  bekannt (Qi et al., 2007; Ono und Han, 2000; Zarubin und Han, 2005). Auch sie werden durch Hitzeschock (Hill et al., 2008), Hyperosmose (Sugden und Clerk, 1998), reaktionsfähigen Sauerstoff (Sugden und Clerk, 1998; Sugden, 2001; Clerk et al., 1998) und Hypoxie/Reoxygenierung (Sugden und Clerk, 1998) bzw. Ischämie/Reperfusion (Bogoyevitch et al., 1996; Clerk et al., 1998) sowie durch proinflammatorische Zytokine (Sugden und Clerk, 1998; Hill et al., 2008; Turner et al., 2007 b; Saito et al., 2007), Phenylephrin (Sugden, 2001), Ang II (Hayashida et al., 2001) und Endothelin-1 (Sugden, 2001) aktiviert.

Auch die ERKs werden nicht nur durch Ang II (Hayashida et al., 2001; Ruwhof und van der Laarse, 2000), sondern auch z.B. in kultivierten Kardiomyozyten durch mechanische Dehnung (Yamazaki et al., 1995; Kudoh et al., 1998), durch Noradrenalin (Yamazaki et al., 1997), Endothelin-1 (Yamazaki et al., 1996; Bogoyevitch et al., 1996; Sugden, 2001; Ruwhof und van der Laarse, 2000), Phenylephrin (Liao et al., 2008) oder Zytokine wie TNF $\alpha$  (Saito et al., 2007) aktiviert.

JNKs sind nach dem Transkriptionsfaktor benannt worden, der zuerst als ihr Substrat identifiziert wurde (Ruwhof und van der Laarse, 2000): c-Jun. Weitere Transkriptionsfaktoren, die von JNKs phosphoryliert werden, sind Elk-1 (Sugden und Clerk, 1998) und ATF2 (activating transcription factor) (Ruwhof und van der Laarse, 2000; Sugden und Clerk, 1998). P53 wird ebenfalls von JNKs aktiviert, was zu Apoptose führt (Ho et al., 2008). Die JNKs bewirken über die von ihnen aktivierten Substrate unter anderem Apoptose (Kyriakis und Avruch, 2001), Hypertrophie von Kardiomyozyten (Kyriakis und Avruch, 2001) und spielen eine Rolle bei der Reifung und Aktivierung von T-Zellen (Kyriakis und Avruch, 2001).

Die Substrate von p38 sind ebenfalls verschiedene Transkriptionsfaktoren wie ATF2 (Sugden und Clerk, 1998), c-myc (Ruwhof und van der Laarse, 2000), CHOP10/GADD153 (Sugden und Clerk, 1998), STAT (Decker und Kovarik, 2000; Vanhatupa et al., 2008) und MEF2C (myocyte enhancement factor) (Sugden und Clerk, 1998) sowie p53 (Ho et al., 2008). Außerdem aktivieren p38-MAP-Kinasen MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinasen 2 und 3 (MAPKAPK 2 und 3), die das kleine Hitzeschock-Protein Hsp25/27 phosphorylieren, welches zytoprotektive Wirkung hat (Sugden und Clerk, 1998). Weitere von p38 aktivierte Proteinkinasen sind MSK 1 (Deak et al., 1998), Mnk1 und Mnk2 (Sugden und Clerk, 1998) und PRAK (p38-related/activated protein kinase) (Qi et al., 2007). In einer 2007 erschienenen Arbeit wurde gezeigt, dass die p38 $\alpha$ -Isoform den Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert, während die  $\gamma$ -Isoform die Aktivierung von c-Jun verhindert (Qi et al., 2007). Die z.T. recht unterschiedlichen Wirkungen von p38 wie Apoptoseauslösung (Wang et al., 1998) aber auch antiapoptotische Wirkungen (Zechner et al., 1998), Regulierung der Zelldifferenzierung (Ono und Han, 2000), Hypertrophieauslösung in Kardiomyozyten (Wang et al., 1998), die Anregung der Bildung von Zytokinen (Zarubin und Han, 2005) usw. lassen sich durch die Existenz der unterschiedlichen Isoformen gut erklären. Im Herzen werden hauptsächlich p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  exprimiert (Saurin et al., 2000). P38 $\alpha$  ist ubiquitär und die am häufigsten vorkommende Isoform (Qi et al., 2007), die zur Apoptoseauslösung beiträgt (Wang et al., 1998), eine Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt (Qi et al., 2007) und die Aktivität des Ras-Onkogens hemmt (Qi et al., 2007). Die  $\gamma$ -Isoform-Expression hingegen wird von dem Ras-Onkogen induziert, wodurch das Ras-Onkogen wiederum aktiviert wird (Qi et al., 2007). Z.T. scheinen die verschiedenen Isoformen also auch antagonistische Wirkungen zu haben. Die p38 $\beta$ -Isoform ist mit der Induktion von Hypertrophie in Kardiomyozyten assoziiert (Wang et al., 1998). Während des Fortschreitens der Hypertrophie sind sowohl der p38 $\alpha$ - als auch der p38 $\beta$ -Spiegel erhöht (Zarubin und Han, 2005). Im Allgemeinen wird p38 $\alpha$  eher mit dem Zelltod und p38 $\beta$  eher mit deren Überleben in Verbindung gebracht (Das et al., 2007).

Auch p44/42 aktiviert eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1 (Ruwhof und van der Laarse, 2000), c-Fos (Murphy et al., 2002), c-Jun (Ruwhof und van der Laarse, 2000), STAT1/3 und 5a (Yoon und Seger, 2006) sowie – zusammen mit p38 – ATF2 (Ouwens et al., 2002). Desweiteren werden Proteinkinasen wie z.B.

MSK 1/2 (Yoon und Seger, 2006; Deak et al., 1998) und Mnk1/2 (Yoon und Seger, 2006) sowie Phosphatasen (Yoon und Seger, 2006), Elemente des Zytoskeletts (Yoon und Seger, 2006), Apoptose-regulierende Proteine und Proteinasen (Yoon und Seger, 2006) sowie nicht wenige weitere Proteine durch ERKs phosphoryliert. Insgesamt sind um die 160 Substrate dieser MAP-Kinasen bekannt (Yoon und Seger, 2006). Die p44/42-MAP-Kinasen sind mit Zellwachstum und –proliferation von Kardiomyozyten assoziiert (Sugden, 2001; Clerk und Sugden, 2004; Bueno und Molkentin, 2002) und spielen eine Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie von Kardiomyozyten (Sugden, 2001; Bueno und Molkentin, 2002). Sie scheinen eher eine antiapoptotische Wirkung zu haben (Purcell et al., 2007; Das et al., 2007), obwohl eine chinesische Arbeitsgruppe in einer im Juni 2008 erschienenen Arbeit gezeigt hat, dass SOCS-1 (suppressor of cytokine signalling-1) die durch TNF $\alpha$  induzierte Apoptose von kultivierten Kardiomyozyten über den p44/42-Signaltransduktionsweg nicht aber über den p38- oder JNK-Signaltransduktionsweg hemmt (Yan et al., 2008).

### **1.3. Kalzium-Homöostase**

Im Sinusknoten im rechten Vorhof wird in regelmäßigen Intervallen eine elektrische Erregung gebildet und an den atrioventrikulären (AV-) Knoten weitergeleitet. Dieser ist der einzige Überleitungsweg zwischen den Vorhöfen und den Kammern des Herzens. Von ihm gelangt das Aktionspotential über das His'sche Bündel und die Purkinje-Fasern in das Myokard und bewirkt eine synchrone Kontraktion der gesamten Ventrikelmuskulatur. In den einzelnen Kardiomyozyten kommt es durch die elektrische Erregung zu einem Kalzium- ( $\text{Ca}^{++}$ -) Einstrom, der zum überwiegenden Teil über L-Typ Kanäle erfolgt. Die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen triggern die Freisetzung von  $\text{Ca}^{++}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Fabiato und Fabiato, 1975), das quasi einen zelleigenen  $\text{Ca}^{++}$ -Speicher darstellt. Dadurch steigt die  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration in der Zelle in kürzester Zeit stark an. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen wird die Konformation des Troponinmoleküls so verändert, dass Bindungsplätze für Myosin am Aktin frei werden und sich die beiden Proteine miteinander vernetzen können. Die zuvor unter ATP-Spaltung „vorgespannten“ Myosinköpfchen kippen wieder in ihre Ausgangsstellung zurück und ziehen dabei an den Aktinfilamenten. Dadurch verkürzt sich der einzelne Kardiomyozyt und somit

das gesamte Myokard. Anschließend muss der Herzmuskel wieder erschlaffen, damit sich der Ventrikel erneut mit einer adäquaten Blutmenge füllen kann und eine erneute Kontraktion möglich wird. Dafür ist die Lösung der Aktin-Myosin-Verbindung erforderlich. Diese setzt bei einer Reduktion der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und einer daraus folgenden Dissoziation des  $\text{Ca}^{++}$ -Troponinkomplexes ein. Am Myosinköpfchen lagert sich ATP an, und um das Aktinfilament schlingen sich wieder die Tropomyosinfäden, die dann die Bindungsstellen für die Myosinköpfchen bedecken.

Für eine schnelle Absenkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ist eine rasche Wiederaufnahme des  $\text{Ca}^{++}$  in das SR verantwortlich (Carafoli, 1985). Dies erfolgt aktiv durch eine membranständige ATPase, die sarko(endo)plasmatische Retikulum-  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase (SERCA). Es gibt mehrere Isoformen, die von drei verschiedenen Genen – *SERCA1*, 2 und 3 – kodiert werden (Periasamy und Kalyanasundaram, 2007). Im Herzen wird die Isoform 2a exprimiert (Arai et al., 1994). Das Molekulargewicht der SERCA 2a beträgt rund 110 kDa. Sie ist vor allem im SR-Netzwerk rund um die Myofibrillen lokalisiert, weniger dagegen im transversalen Anteil. Unter ATP-Verbrauch werden jeweils zwei  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen aus dem Zytosol in das Lumen des SR transportiert (Inesi et al., 1990). Reguliert wird die Aktivität der SERCA durch Phospholamban (Mattiuzzi et al., 2005). An der zytosolischen Seite dieses Proteins, das ebenfalls in der longitudinalen SR-Membran lokalisiert ist, befindet sich die Domäne für die Wechselwirkung mit der SERCA (Schmidt et al., 2002). Im unphosphorylierten Zustand hat es auf sie einen inhibitorischen Einfluss (Shannon et al., 2001; Mattiuzzi et al., 2005). Wird Phospholamban, das ein Pentamer darstellt (Molekulargewicht des Monomers: rund 6 kDa) (Schmidt et al., 2002), phosphoryliert, erhöht es die  $\text{Ca}^{++}$ -Affinität der SERCA. Diese transportiert dadurch mehr  $\text{Ca}^{++}$  pro Zeiteinheit (Schmidt et al., 2002). Die Phosphorylierung von Phospholamban erfolgt in erster Linie durch die Proteinkinase A. Es kann aber auch über die Kalzium-Kalmodulin-abhängige Proteinkinase und in geringerem Maße durch die Proteinkinase C sowie einer cGMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden (Tada et al., 1974; Raeymaekers et al., 1988; Kirchberger et al., 1974). Die Phosphorylierung erfolgt an zwei Aminosäureresten: Serin-16 und Threonin-17 (Schmidt et al., 2002; Mattiuzzi et al., 2005).

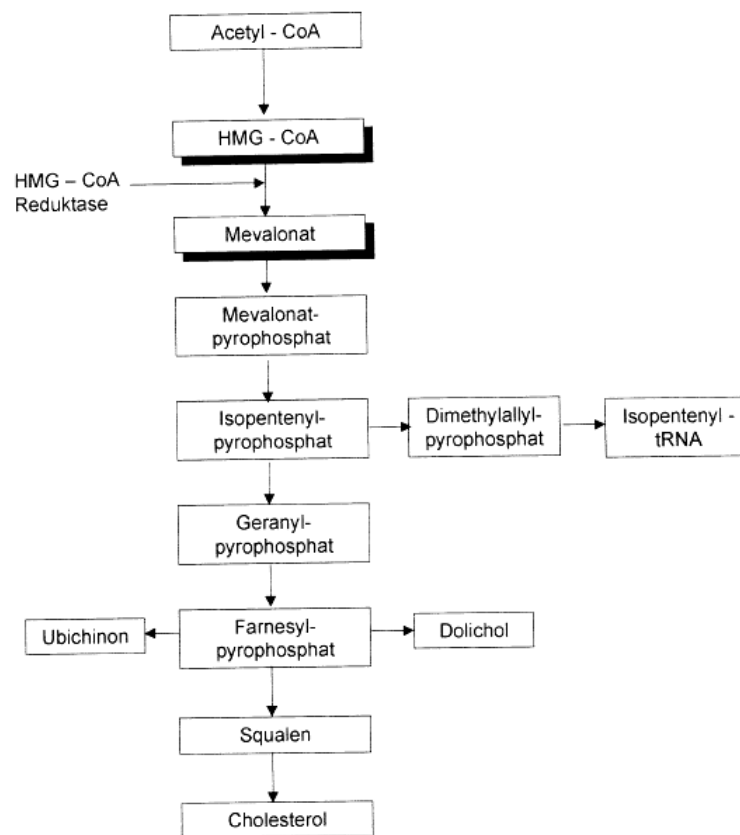
Eine gestörte  $\text{Ca}^{++}$ -Homöostase ist in entscheidendem Maße für kontraktile Funktionsstörungen in hypertrophierten und insuffizienten Herzen verantwortlich (Carre et al., 1993). Beim versagenden Herzen wird die SERCA2a in einem unzureichenden Maße exprimiert (Arai et al., 1994) bzw. zeigt eine verminderte Aktivität (Schwinger et al., 1995; Flesch et al., 1996). Wird dadurch das  $\text{Ca}^{++}$  nur unzureichend in das SR zurücktransportiert, liegen erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{++}$ -Spiegel vor, wodurch sich das Myokard nicht adäquat relaxieren kann. Dementsprechend können sich die Ventrikel nicht angemessen füllen. Ebenso fehlt für eine nachfolgende Kontraktion der massive  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom aus dem SR in die Zelle. Es können also diastolische und systolische Funktionsstörungen auftreten.

In kultivierten neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte konnte gezeigt werden, dass durch Phenylephrin hypertrophierte Zellen sehr früh einen reduzierten Gehalt an SERCA2-mRNA aufwiesen. Mit einiger Verzögerung sanken dann auch die SERCA-Proteinspiegel und die Kalzium-Transportaktivität (Prasad et al., 2007).



## 1.4. HMGCoA-Reduktasehemmer

Die ersten HMGCoA-Reduktasehemmer wurden ursprünglich aus einem *Penicillium*- (Mevastatin) bzw. aus einem *Aspergillus*-Pilz (Lovastatin) isoliert (Liao und Laufs, 2005). Die weiteren sogenannten Statine entstanden zunächst durch chemische Modifikationen der Seitenkette. Als erster voll synthetischer Enzyminhibitor wurde Fluvastatin entwickelt (Deslypere, 1994). Statine hemmen kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, die HMGCoA-Reduktase, und damit die Umwandlung von HMGCoA in Mevalonat (Brown und Goldstein, 1980; Henwood und Heel, 1988; Todd und Goa, 1990). Es gibt hydrophile HMGCoA-Reduktasehemmer, zu denen Pravastatin, Fluvastatin und Rosuvastatin zählen, und lipophile Statine wie z.B. Lovastatin, Simvastatin, Pitavastatin, Atorvastatin und das Anfang dieses Jahrtausends vom Markt genommene Cerivastatin. Simvastatin und Pravastatin zählen zur zweiten Generation der HMGCoA-Reduktasehemmer, Fluvastatin, Cerivastatin, Pitavastatin, Rosuvastatin und Atorvastatin zur neueren dritten Generation (Liao und Laufs, 2005). HMGCoA-Reduktasehemmer zeigen bereits in Dosierungen von z.B. 5 mg zwei mal täglich für Pravastatin (Pan et al., 1990) bzw. 10 mg pro Tag für Simvastatin (Blum, 1994) deutlich Gesamt-Cholesterin- und low density lipoprotein (LDL)-Cholesterin-senkende Eigenschaften. Dies geschieht durch zwei verschiedene Mechanismen: Zum einen wird die endogene Cholesterin-Biosynthese gehemmt, zum anderen wird der LDL-Rezeptor stimuliert (Liao und Laufs, 2005). In diversen Studien wurden Dosierungen der verschiedenen Statine zwischen 5 und 80 mg pro Dosis eingesetzt. Es zeigte sich nicht nur eine Dosisabhängigkeit für die Intensität der LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-senkenden Wirkung sondern auch für einen – wenn auch nur leichten – Anstieg des high density lipoprotein (HDL)-Cholesterins (Blum, 1994; Todd und Goa, 1990; Pan et al., 1990; Henwood und Heel, 1988). Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit (Blum, 1994) und ihrer guten Cholesterin- und Triglyzerid-senkenden Wirkung gehören HMGCoA-Reduktasehemmer zur Standardtherapie und –prävention der koronaren Herzkrankheit.



nach Brown und Goldstein, 1980

**Abbildung 2:** Mevalonat-Signaltransduktionsweg

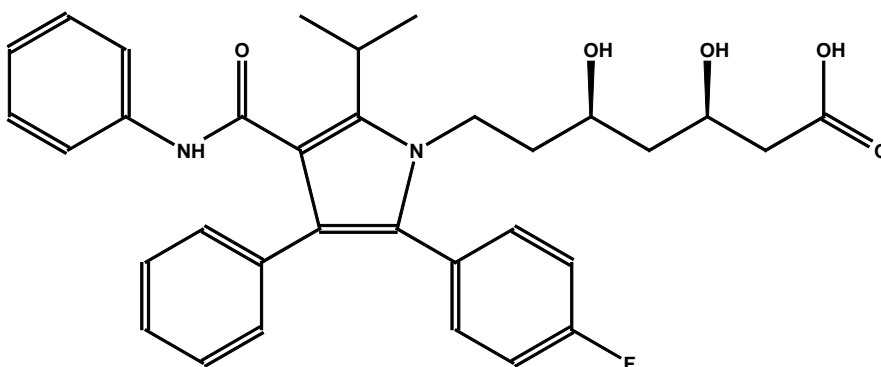
#### 1.4.1. Cholesterin-unabhängige Effekte von HMGC<sub>o</sub>A-Reduktasehemmern

Es mehren sich Hinweise, wonach HMGC<sub>o</sub>A-Reduktasehemmer positive Auswirkungen auf das koronare Risiko haben, die sich nicht allein mit deren cholesterinsenkender Wirkung erklären lassen (Maron et al., 2000; Ridker et al., 1999; Grundy, 1998; Ong, 2002; Vaughan et al., 1996). So führten sie zu einer Heraufregulation der endothelialen NO-Synthase in menschlichen Endothelzellen *in vitro* – und hierüber möglicherweise zu einer Verbesserung der Endothelfunktion – bzw. *in vivo* in Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsversuchen (Laufs et al., 1997; Laufs et al., 1998; Jones et al., 2002). Außerdem hemmen sie die Sekretion von Typ IV-Kollagen *in vitro* (Nishimura et al., 1999) und das Wachstum glatter Muskelzellen aus Blutgefäßen (Laufs et al., 1999). Desweiteren haben HMGC<sub>o</sub>A-Reduktasehemmer antiinflammatorische (Di Napoli et al., 2002; Ni et al., 2001) und antioxidative (Di Napoli et al., 2002; Davignon et al., 2004) Eigenschaften. Diese

Effekte scheinen zum großen Teil über Wirkungen der HMGCoA-Reduktasehemmer auf das kleine G-Protein RhoA vermittelt zu sein (Laufs et al., 1999; Ni et al., 2001; Mital und Liao, 2004, Shiga et al., 2005). Versuche an Kaninchen, bei denen eine chronische Herzinsuffizienz durch Tachykardie (100 Schläge über der Herzfrequenz in Ruhe; bis zu 340 Schläge pro Minute) verursacht wurde, zeigten, dass eine Therapie mit Simvastatin die linksventrikuläre Ejektionsfraktion verbessern konnte. Die Tachykardie wurde mittels einer am Epikard angebrachten Elektrode ausgelöst (Gao et al., 2003).

Eine im Jahre 2005 erschienene Publikation befasst sich ausführlich mit den cholesterin-unabhängigen Effekten der Statine und der Erläuterung der zugrundeliegenden Mechanismen. Als bedeutendste cholesterin-unabhängige Wirkungen der HMGCoA-Reduktasehemmer seien hier die Verbesserung der Endothelfunktion sowie der Neubildung von Blutgefäßen (dieser Effekt wird allerdings in höheren Statin-Dosierungen kontrovers diskutiert), antiproliferative, vor Arteriosklerose schützende Effekte auf Gefäßmuskelzellen z.B. im Falle der Beschädigung einer Gefäßwand, antithrombotische Effekte, entzündungshemmende Eigenschaften und antioxidative Effekte genannt (Liao und Laufs, 2005).

An transgenen Ratten, die durch die Expressierung des menschlichen Renin- und Angiotensinogen-Gens eine Hypertonie entwickelten, wurde gezeigt, dass eine dreiwöchige Behandlung mit Cerivastatin eine Nierenschädigung abschwächen konnte (Park et al., 2000). Durch die Therapie mit dem HMGCoA-Reduktasehemmer konnte hier eine Aktivierung der p44/42- MAP-Kinasen vermindert werden.



**Abbildung 3:** Strukturfelme des lipophilen HMGCoA-Reduktasehemmers Atorvastatin nach Goosen et al., 2007.

#### **1.4.2. HMGCoA-Reduktasehemmer und Myokardhypertrophie**

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass HMGCoA-Reduktasehemmer antihypertrophe Wirkungen haben. So hat eine deutsche Arbeitsgruppe für humanes Renin und Angiotensinogen transgene Ratten drei Wochen lang mit Cerivastatin behandelt und festgestellt, dass das deutlich erhöhte relative Herzgewicht der transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren durch Cerivastatintherapie abgeschwächt wurde (Dechend et al., 2001 b). Durch eine Therapie mit Simvastatin konnte die Ausbildung einer Myokardhypertrophie und einer Aktivierung des myokardialen Angiotensinkonversionsenzyms bei Ratten mit einer Aortenstenose vermindert werden (Luo et al., 1999). Ebenfalls konnte die durch Q403  $\beta$ -Myosin-Überexpression verursachte Myokardhypertrophie und -fibrose bei Kaninchen durch eine Behandlung mit Simvastatin vermindert werden (Patel et al., 2001). Sprague-Dawley-Ratten, denen Angiotensin II mittels einer osmotischen Minipumpe verabreicht wurde, entwickelten eine Hypertrophie des linken Ventrikels, was durch eine Therapie mit Simvastatin dosisabhängig verhindert wurde (Takemoto et al., 2001). In derselben Arbeit wird gezeigt, dass auch die durch eine operative Verengung der Aorta verursachten Anzeichen einer Hypertrophie des Herzens, wie z.B. unter anderem eine Zunahme der Dicke der Herzhinterwand, durch Simvastatin abgeschwächt wurden. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch eine Therapie mit Cerivastatin bei Renin-transgenen Ratten das im Vergleich zu den Sprague-Dawley-Kontrollratten erhöhte relative linksventrikuläre Gewicht gesenkt und der Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion entgegengewirkt werden konnte.

Eine durch Noradrenalin induzierte Hypertrophie von neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte konnte durch Simvastatin vermindert werden (Luo et al., 2002). In einer weiteren Publikation wird berichtet, dass Lovastatin – ebenfalls in neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte – die durch Angiotensin II gesteigerte p44/42-MAP-Kinasen-Aktivität statistisch signifikant gesenkt hat, was durch Mevalonat wieder aufgehoben wurde. Die durch Angiotensin II-Wirkung verursachte Hypertrophie dieser kultivierten Zellen wurde durch das Lovastatin verhindert (Oi et al., 1999). Analoge Ergebnisse erhielten Takemoto et al. (2005) mit Simvastatin. Sie ermittelten sowohl den Proteingehalt der Herzmuskelzellen und die Exprimierung fetaler Gene als Hypertrophiemarker als auch die Größe der Zellen ohne jedoch die Aktivität der

MAP-Kinasen zu untersuchen. Aufgrund weiterer Ergebnisse schlussfolgerten die Autoren, dass der Effekt des Statins durch die kleinen G-Proteine Rac 1 und Rho A vermittelt werden. Auch in der bereits oben genannten Veröffentlichung von Dechend et al. (2001 b) sind ebenfalls Ergebnisse von In-Vitro-Experimenten dargestellt. Es wird auch hier gezeigt, dass Cerivastatin die Phosphorylierung von p44/42 *in vitro* blockiert.

## 1.5. Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung, ob eine Therapie mit HMGCoA-Reduktasehemmern geeignet ist, eine hypertrophe Kardiomyopathie und eine daraus resultierende kontraktile Dysfunktion günstig zu beeinflussen. Die u.a. an Patienten gemachten Beobachtungen, dass HMGCoA-Reduktasehemmer cholesterinunabhängig günstige Effekte auf die Endothelfunktion (Vaughan et al., 1996; Laufs et al., 1997; Laufs et al., 1998; Jones et al., 2002), den Kollagengehalt des Gewebes (Nishimura et al., 1999; Patel et al., 2001), die kontraktile Funktion des Herzens (Gao et al., 2003; Mital und Liao, 2004) sowie das Wachstum von Kardiomyozyten haben (Oi et al., 1999; Luo et al., 2002), weckten das Interesse vieler Arbeitsgruppen, so dass bereits zahlreiche Publikationen vorliegen, die sich mit den antiinflammatorischen, antifibrotischen, antioxidativen und antiproliferativen Wirkungen etc. der sogenannten Statine befassen.

Der Einsatz von HMGCoA-Reduktasehemmern könnte auch einen zusätzlichen Therapieansatz bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz darstellen. So wurde im September 2003 eine groß angelegte randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Multicenterstudie an älteren Patienten (Mindestalter: sechzig Jahre) mit systolischer Herzinsuffizienz (New York Heart Association Klasse II, III oder IV), denen täglich 10 mg Rosuvastatin verabreicht wurde, gestartet (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure, CORONA-Studie, Kjeldsen et al., 2007). Es sollte beobachtet werden, wie sich eine Therapie mit dem HMGCoA-Reduktasehemmer zusätzlich zur bereits zuvor gegebenen Medikation auf die Prognose auswirkt. Da auch die Signaltransduktionswege, über die Statine ihre Wirkung entfalten, von Interesse sind, sind Tierversuche und In-Vitro-Experimente sinnvoll, um die Wirkungsweise dieser Substanzen aufzuklären.

Da die SERCA bei der Kontraktion der Ventrikel eine wesentliche Rolle spielt und bei insuffizienten Herzen eine geringere Aktivität zeigt bzw. in geringerem Maße exprimiert wird, könnte sie oder ein sie regulierendes Protein ein möglicher Angriffspunkt einer HMGCoA-Reduktasehemmer-Wirkung sein, die die Kontraktilität der Herzkammern verbessert.

Weitere mögliche Angriffspunkte für HMGCoA-Reduktasehemmer könnten die MAP-Kinasen darstellen. Da sie sowohl inflammatorische als auch proliferative und hypertrophieinduzierende Effekte auslösen, könnten somit gleich mehrere cholesterinunabhängige Wirkungen der HMGCoA-Reduktasehemmer erklärt werden.

Im einzelnen sollen in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Kann durch eine Therapie mit dem lipophilen HMGCoA-Reduktasehemmer Atorvastatin die Ausbildung einer Myokardhypertrophie und einer kontraktile Dysfunktion vermindert werden?
- 2.) Wirkt sich die Behandlung mit Atorvastatin positiv auf den linksventrikulären myokardialen Gehalt an der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums bzw. ihres Regulatorproteins, des Phospholambans aus?
- 3.) Können die erwarteten günstigen Effekte durch eine verminderte p38- und/oder p44/42-MAP-Kinaseaktivierung erklärt werden?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Antikörper, Materialien und Geräte

#### 2.1.1. Antikörper

GAPDH (FL335)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA
Monoclonal Antibody to human prolyl Hydroxylase beta (Fibroblast Marker)	AcrisAntibodiesGmbH,Hiddenhausen
Phospholamban	ABR Affinity Bio Reagents, Golden, CO
Phospho-Serin-16-Phospholamban	Fluorescence Ltd., Leeds, UK
p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
p38 MAPK	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
p38(pTpY180/182) MAPK	BioSource International, Camarillo, CA
SERCA 2a	ABR Affinity BioReagents, Golden, CO
Sek. Antikörper Anti-Kaninchen, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Sek. Antikörper Anti-Maus, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Sek. Antikörper (Ziege) Anti-Maus, biotinyliert	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

#### 2.1.2. Materialien für die Tierversuche

Atorvastatin, Reinstoff	Pfizer, New York, NY
Ketanest S	Parke-Davis, Detroit, MI
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid 0,9%ig	Braun, Melsungen
Rompun 2%	Bayer HealthCare Tiergesundheit, Leverkusen

### 2.1.3. Materialien für die Proteinisolation (Gewebeproben)

Benzamidin	Fluka, Buchs, Schweiz
Betaglycerophosphat = Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethan-sulfonsäure (HEPES), Natrium-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose reinst. DAB 10	Merck, Darmstadt
Triton-X-100 (Polyoxyethylen(10)-octylphenylether)	Roche, Mannheim
Trizma Base (Tris[Hydroxymethyl]-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.4. Materialien für die Durchführung der Western-Blots

6-Amino-N-Hexansäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Mixtur: Rotiphorese Gel P30	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blot Papier	Macherey-Nagel, Düren
Bio-Rad Protein Assay	Biorad, Hercules, CA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biorad, Hercules, CA
Bromphenolblau	Biorad, Hercules, CA
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Western Blot Detektionsreagenzien	Amersham, Little Chalfont, UK
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaleidoscope Prestained Standards – Marker	Biorad, Hercules CA
Magermilchpulver 36%ig	Heirler Cenovis, Radolfzell



Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Schuchardt, Hohenbrunn
Nitrozellulose-Membran-TransBlot- Transfer-Medium	Biorad, Hercules, CA
Polysorbat 20 (TWEEN)	Caelo, Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Reagenz für die Photometrie nach Bradford	Biorad, Hercules, CA
Reagenzien für die Photometrie nach Lowry (Reagenz A, B und S)	Biorad, Hercules, CA
Röntgenfilm: Hyperfilm ECL	Amersham, Little Chalfont, UK
Salzsäure (HCl) 5 N	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base (Tris[Hydroxymethyl]- aminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **2.1.5. Materialien für die Zellkultur und Aufbereitung der Zellen sowie Überprüfung des Fibroblasten-Anteils**

Ammoniumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, St
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Atorvastatin, Reinstoff	Pfizer, New York, NY
Aqua Poly/Mount	Polysciences, Warrington, PA
Bovines Serumalbumin, pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, pH 7,0	Serva, Heidelberg
Collagenase Typ II	Biochrom AG, Berlin
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd, wässrige Lösung (Formalin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelatine: Gelatin from porcine skin, Type A	Sigma-Aldrich, Steinheim

Gentamicin: Refobacin 10mg	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Gllucose-Oxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Medium 199 + Earle´s Salts + L-Glutamine + 25mM HEPES + L-Amino Acids	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Schottland
Medium 199 + Hanks Salts + L-Glutamine + 24mM HEPES + L-Amino Acids	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Schottland
Meerrettich-Peroxidase: Streptavidin (biotinyliert)-Meerrettich-Peroxidase -Komplex	Amersham, Little Chalfont, UK
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge (NaOH), 1M und 2M	Merck, Darmstadt
Nickel(II)sulfat-hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS-Dulbecco (1x) mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2</sup>	Biochrom AG, Berlin
Penicillin „Grünenthal“ 1 Mega	Grünenhtal GmbH, Aachen
Pferdeserum/Horse Serum	PromoCell, Heidelberg
Salzsäure (HCl), 1N	Merck, Darmstadt
Triton-X-100 (Polyoxyethylen(10)- octylphenylether)	Roche, Mannheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim

Wasserstoffperoxid  
Xylol

Merck, Darmstadt  
Roth, Karlsruhe

### 2.1.6. Geräte

Blotkammer: TE 77	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Blutgasanalysegerät (zum Einstellen des pH-Wertes und Überprüfen des Ionen- gehaltes für Puffer für die Zellkultur verwendet): ABL 510/EML 105	Radiometer, Copenhagen, Dänemark
Elektrophoresekammer: Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Feinwaage: Mettler HK 160	Mettler, Gießen
Heizschüttler: Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Herzkatheter: 2F Millar microtip catheter	Millar Instruments, Houston, TX
Homogenisator: Potter S	B. Braun Biotech int., Melsungen
Inkubator: Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Knopfkanülen: gerade, 1,2 x 60 mm, gerade 1,0 x 40 mm und gebogen, 1,0 x 40 mm)	Heiland, Hamburg
Mikroskop: Orthoplan 806277	Leitz, Wetzlar
Mini-Schüttler: Minishaker MS 2	IKA, Staufen
Motorhandstück MHX(E): Xenox	Proxxon, Niersbach
MRT: Gyroscan Intera 1,5 T	Philips, Eindhoven, Niederlande
Photometer: DU 640 Spectrophotometer GeneRay UV-Photometer	Beckman Coulter, Fullerton, CA Biometra, Göttingen
pH-Meter: 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten (0,5-10, 10-100, 100-1000 µl): Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe: Automatic Sarpette	Desaga, Wiesloch
Röntgenfilmentwicklungsgerät: Curix 60	AGFA, Köln
Röntgenfilmkassette: Hypercassette	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Schüttler: Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Sterilbank: Hera safe	Heraeus, Hanau
Sterilfilter: Stericup SCGPU01RE, 150 ml	Millipore, Billerica, MA
Thermomagnetrührer: SB162	Stuart, Dublin, Irland
Transformator: Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge: Beckman Coulter Optima™ LE-80K + Rotor: Type: SW 41, Serial No.	

2385	Beckman Coulter, Fullerton, CA
Waage: TE212	Sartorius, Göttingen
Wasserbad: RC 20 Lauda	Lauda Dr. R. Wosser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifugen: Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 1 L-R, Rotor: 8760	Heraeus, Hanau
Sepatech Suprafuge 22, Rotor: HFA 18.50	
No.51.55	Heraeus, Hanau

## 2.2. Tiermodell

Als Versuchsmodell dienten männliche heterozygot transgene Sprague-Dawley-Ratten, die das Mäuserenin Ren2d überexprimieren (TG(mREN2)27) (Mullins et al., 1990; Nickenig et al., 1997), wodurch sie eine Aktivierung des gewebeständigen Renin-Angiotensin-Systems (Flesch et al., 1997 a), eine arterielle Hypertonie (Mullins et al., 1990; Moriguchi et al., 1994; Paul et al., 1994) und eine Myokardhypertrophie (Bachmann et al., 1992; Nickenig et al., 1997; Paul et al., 1994) bei niedrigen Plasmapreninspiegeln (Mullins et al., 1990; Paul et al., 1994) entwickeln. Bei diesen, im folgenden Text Renin-transgene oder transgene Ratten (TG) genannten Tieren führt eine Aktivierung des gewebeständigen Renin-Angiotensin-Systems zu einem lokalen Anstieg der Konzentration an Angiotensin II (Nickenig et al., 1997; Paul et al., 1994; Whaley-Connell et al., 2006). Das Myokard dieser Tiere zeigt Veränderungen, die in vielen Punkten denen der chronischen Herzinsuffizienz beim Menschen entsprechen. Die Dichte der  $\beta$ -Adrenozeptoren ist im Myokard des linken Ventrikels herabgesetzt (Böhm et al., 1994), der Gehalt an inhibitorischen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen ist erhöht (Böhm et al., 1994), und es kommt zu einer Zunahme extrazellulärer Matrixproteine (Flesch et al., 1997 a). Die Herzen weisen eine funktionell verminderte inotrope Stimulierbarkeit durch Katecholamine und eine Relaxationsstörung auf (Flesch et al., 1997 a). Desweiteren konnte bei diesen Tieren eine verminderte Expression der SERCA2a und des Phospholambans nachgewiesen werden (Flesch et al., 1997 a), was so auch im insuffizienten menschlichen Myokard festgestellt werden kann (Flesch et al., 1996). Außerdem wiesen die transgenen Ratten eine Herabregulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors auf (Nickenig et al., 1997).

Die transgenen Ratten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen die eine mit 30 mg/kg Körpergewicht des lipophilen HMGCoA-Reduktasehemmers Atorvastatin gelöst in Methylcellulose-Lösung, die andere mit Methylcellulose-Lösung als Placebo p.o. mittels Gavage behandelt wurde. Die Behandlung erfolgte von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche. Als Kontrollgruppe wurden Sprague-Dawley-Ratten (SD) gleichen Alters und Geschlechtes verwendet, die ebenfalls 30 mg/kg Körpergewicht Atorvastatin bzw. Placebo erhielten.

### **2.3. Magnetresonanztomographische Untersuchungen am Rattenherzen**

Kardiale Kernspintomographieuntersuchungen wurden mit Hilfe eines Philips-1,5-T-Magnetresonanztomographen durchgeführt. Die Ratten wurden mit einer Mischung aus Xylazin (20 mg/ml) und Ketamin (100 mg/ml) (1 ml Xylazin-Lösung und 1 ml Ketamin-Lösung mit isotoner Kochsalzlösung auf 5 ml aufgefüllt, davon rund 1,5 ml pro Ratte) narkotisiert und auf dem Rücken liegend auf der Untersuchungsfläche fixiert. An den Extremitäten wurden EKG-Ableitungen und über dem Thorax eine Oberflächenspule zur Bilderfassung befestigt. Pro Rattenherz wurden je zwölf Bilder im Querschnitt von der Basis bis zur Apex in den verschiedenen Kontraktionsphasen des Herzmuskels angefertigt und digital gespeichert.

Die Auswertung dieser Bilder erfolgte mit Hilfe der Software des Magnetresonanztomographen. Die Abbildungen mit der jeweils größten Kammerdimension wurden zur Datenanalyse des Herzens in der Enddiastole, die Abbildungen mit der jeweils kleinsten Kammerdimension zur Datenanalyse in der Endsystole verwendet. Zur Berechnung der linksventrikulären Masse wurden die epi- und endokardialen Begrenzungen der Herzkammer in Enddiastole von Hand eingezeichnet. Die Software berücksichtigte bei der Berechnung des Volumens des eingezeichneten Bereiches die Schichtdicke automatisch und gab das jeweilige Ergebnis in  $\text{cm}^3$  an, sodass die für die einzelnen Schnittebenen berechneten Werte nur noch addiert und mit dem spezifischen Gewicht von Herzgewebe ( $1,05 \text{ g/cm}^3$ ) multipliziert werden mussten, um die linksventrikuläre Masse zu berechnen. Zur Berechnung des enddiastolischen linksventrikulären Volumens wurden die

endokardialen Grenzlinien durch Zeichnung von Hand definiert, sodass die Software das Volumen des Hohlraumes innerhalb der Herzkammer berechnen konnte und wiederum nur noch die einzelnen Schichten addiert werden mussten. Zur Ermittlung des Schlagvolumens wurde dies zusätzlich in der Endsystole durchgeführt und anschließend die Differenz zur Enddiastole, die dann dem Blutausschuss pro Herzschlag in  $\text{cm}^3$  entspricht, berechnet.

Zur Ermittlung der enddiastolischen linksventrikulären Wanddicke wurde in einem Querschnittsbild auf Papillarmuskelhöhe manuell eine Linie über die jeweils gleiche Stelle der Kammerwand vom Epicard zum Endocard in Richtung Mittelpunkt gelegt. Die Angabe der Strichlänge erfolgte in mm. Des Weiteren wurde der Durchmesser des linken Ventrikels durch manuelles Einzeichnen einer durch den Mittelpunkt verlaufenden Linie ermittelt, dessen Ergebnis ebenfalls in mm ausgewiesen wurde.

## **2.4. Untersuchung der kontraktiven Funktion der Rattenherzen *in vivo* mittels Millar-Katheter**

Die Untersuchung der kontraktiven Funktion *in vivo* erfolgte im Kardiovaskulären Forschungsinstitut Maastricht, Universitätskrankenhaus Maastricht, Niederlande. Die Tiere wurden anästhesiert, über die rechte Arteria carotis wurde ein 2F Millar-Microtip-Katheter eingeführt und in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Signale wurden verstärkt, digital gespeichert und mit IdeeQ (IDEE; Maastricht University) ausgewertet. Vor Beginn der Messungen wurde der Drucksensor in 37°C warmes Wasser getaucht, um eine Grundlinie für einen Druck von 0 mmHg zu erhalten. Nach einer Stabilisationsphase wurden die Herzfrequenz sowie der maximale linksventrikuläre systolische Blutdruck gemessen. Des Weiteren wurden die Druckerhöhungs- und die Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt.

## **2.5. Gewebebegewinnung**

Zur Gewebebegewinnung wurden die Ratten in Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen und Lungen unmittelbar darauf entnommen. Die Herzen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung von noch vorhandenem Blut gereinigt und die Atrien wurden entfernt. Rechter und linker Ventrikel wurden voneinander getrennt und anschließend gewogen. Die linken Ventrikel wurden in 5 Teile – Apex, Mitte, Septum und zwei Stücke von der Basis – geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C gelagert.

## **2.6. Bestimmung des myokardialen Kollagengehaltes**

Zur Bestimmung des myokardialen Kollagengehalts wurde ein Teil des linksventrikulären Gewebes nach Fixierung in 1%igem Paraformaldehyd und anschließendem dreimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) in Paraffin eingebettet, und histologische Schnitte wurden angefertigt. Dies erfolgte im Labor von Dr. Yigal Pinto, Experimentelle und Molekulare Kardiologie, Kardiovaskuläres Forschungsinstitut Maastricht, Universitätskrankenhaus Maastricht, Niederlande. Ein Teil der Schnitte wurde im selben Labor gefärbt und mittels Planimetrie per Computer ausgewertet. Dazu wurden die Schnitte im Wesentlichen wie unten beschrieben behandelt, wobei Fast Green allerdings nicht verwendet wurde.

Ein weiterer Teil der Paraffinschnitte wurde im Pharma Research Center der Bayer HealthCare AG, Wuppertal mit Pikro-Siriusrot und Fast Green gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zunächst drei Mal fünf Minuten lang in Rotihistol (nichttoxisches Lösungsmittel, das als Alternative zu Xylol eingesetzt werden kann) inkubiert, anschließend erst mit 100%igem, dann mit 80%igem Ethanol und schließlich mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte die eigentliche Färbung mit Siriusrot, das am Tag zuvor in gesättigter Pikrinsäure gelöst wurde (0,4 g pro 100 ml Säure), in einem zehnminütigen Inkubationsschritt. Nach einer Inkubation von 30 Sekunden Dauer in verdünnter Essigsäure (10 ml Essigsäure mit 22 ml destilliertem Wasser) wurden die Gewebeschnitte eine Minute lang mit fließendem destilliertem Wasser gespült und mit Fast Green (am Tag zuvor angesetzt, 0,1 g auf 100 ml gesättigte Pikrinsäure) in einer Einwirkzeit von zwei Minuten gegengefärbt. Im Anschluss

erfolgte wieder eine Inkubation mit verdünnter Essigsäure (s.o.) und einminütiges Spülen mit fließendem destilliertem Wasser. Es folgten zwei Spülschritte zunächst mit 80%igem, dann mit 100%igem Ethanol zum Entwässern und abschließend wieder drei Inkubationsschritte von jeweils fünf Minuten Dauer in Rotihistol. Nach ca. zehn Minuten, in denen die Schnitte im Brutschrank trocknen gelassen wurden damit das Rotihistol verdunstet, wurden sie mit dem Schnelleinschlussmittel DePeX Mounting Medium eingedeckt. Durch das Pikro-Siriusrot wird Kollagen rot gefärbt. Die Gegenfärbung des Muskelgewebes mit Fast Green diente der Verbesserung des Kontrasts zum Bindegewebe. Die Auswertung erfolgte per Computer. Das Ergebnis wurde als rot angefärbte Fläche in Prozent der Gesamtfläche des jeweiligen histologischen Schnittes angegeben.

## **2.7. Proteinisolation**

Zur Isolation der myokardialen Proteinlösungen, wie sie zur Western-Blot-Analyse von SERCA2a und Phospholamban verwendet wurden, wurde von jeweils einem Gewebestück aus dem mittleren Bereich des Herzens ein ca. 100 bis 300 mg schweres Teilstück abgetrennt und in einer in flüssigem Stickstoff stehenden und dadurch gekühlten Metallschale pulverisiert. Das Gewebe wurde umgefüllt, Präparationspuffer (3 ml pro Gewebestückchen) zugesetzt, und beides miteinander homogenisiert. Die Zusammensetzung des Puffers war: 300 mmol/l Saccharose, 1mmol/l PMSF, 20 mmol/l PIPES, 10 mmol/l EDTA (Tritriplex) und 50 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat (pH 7,4). Das Homogenisat wurde für 20 Minuten bei 7800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen umgefüllt, durch Zugabe von Präparationspuffer austariert und bei 136000 g für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die so gewonnenen Pellets in je 400 µl Gefrierpuffer resuspendiert. Der Gefrierpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 400 mmol/l Saccharose, 5 mmol/l Hepes, 5 mmol/l Tris, 10 mmol/l EDTA und 50 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat (pH 7,2°C) Alle Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 4°C.

Zur Isolation der zytosolischen myokardialen Proteinlösungen, wie sie zur Analyse der MAP-Kinasen mittels Western-Blot verwendet wurden, wurde von je einem zuvor bei -80°C gelagerten Gewebestück aus dem Bereich des Apex ein jeweils ca. 20 bis



45 mg schweres Stück abgetrennt und wie oben beschrieben pulverisiert. Das Gewebe wurde in eiskaltem Lysierungspuffer (100 µl per 10 mg Gewebe) suspendiert und weiter homogenisiert. Der Lysierungspuffer war wie folgt zusammengesetzt: 20 mmol/l Hepes, 20 mmol/l Betaglycerophosphat, 20 mmol/l Natriumpyrophosphat, 0,2 mmol/l Natriumorthovanadat, 2 mmol/l EDTA, 20 mmol/l Natriumfluorid, 10 mmol/l Benzamidin, 1 mmol/l DTT, 20 µg/ml Leupeptin und 0,05% Triton-X. Die homogenisierten Proben wurden für fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend fünfzehn Minuten lang bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## **2.8. Immunochemische Proteinquantifizierung mittels Western-Blot**

Zur immunochemischen Quantifizierung der MAP-Kinasen (Phospho-)p44/42 und (Phospho-) p38 sowie von SERCA2a, Phospholamban und Phospho-Serin-16-Phospholamban wurde die entsprechende Menge des Proteinpräparates, die je nach eingesetztem Antikörper unterschiedlich ausfiel (siehe Tabelle 1), in einem Mischungsverhältnis von 1:4 mit Probenpuffer versetzt. Dieses Mischungsverhältnis bezieht sich auf das Volumen beider Lösungen. Die Gesamtproteinkonzentration der Proteinlösungen wurde zuvor mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Sets gemäß der Herstelleranweisung (modifizierte Methode nach Lowry) bzw. der Methode nach Bradford ermittelt. Von jeder Probe wurde die gleiche Menge an Gesamtprotein pro Western-Blot-Analyse eingesetzt. Der Probenpuffer enthielt 192,3 mmol/l Tris-HCl (pH 6,8), 8% Natriumdodecylsulfat (SDS), 40% Glycerol, 402 mmol/l DTT und 0,02% Bromphenolblau. Die mit dem Probenpuffer versetzten Proteinproben wurden für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend auf einem SDS-Polacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Sammelgels war 17% (Vol:Vol) Rotiphorese Gel P30, 125 mmol/l Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,05% (Vol:Vol) TEMED und 0,1% Ammoniumpersulfat, die Zusammensetzung des Trenngels variierte je nach quantifiziertem Protein (siehe Tabellen 1 und 2). Je kleiner das Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins war, desto höher war die gewählte Acrylamidkonzentration.

quantifiziertes Protein	Größe des Proteins	verwendete Proteinmenge pro Probe	verwendetes Gel
SERCA2a	110 kDa	10 µg	7,5%ig
Phospholamban	ca. 25 bzw. ca. 6 kDa	10 µg	15%ig
Phospho-Serin-16-Phospholamban	ca. 25 bzw. ca. 6 kDa	10 µg	15%ig
p44/42 MAPK	44/42 kDa	20 µg	10%ig
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	44/42 kDa	20 µg	10%ig
p38 MAPK	38 kDa	20 µg	10%ig
Phospho-p38 MAPK (pTpY180/182)	38 kDa	20 µg	10%ig

**Tabelle 1:** Verwendete Proteinmenge und Gelkonzentration

<b>Gehalt an Acrylamid im Trenngel</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
Tris-HCl	375 mmol/l (pH 8,8)	375 mmol/l (pH 8,8)	375 mmol/l (pH 8,8)
SDS	0,10%	0,10%	0,10%
Rotiphorese Gel P30 (Vol:Vol)	25,00%	33,00%	50,00%
TEMED (Vol:Vol)	0,05%	0,05%	0,05%
Ammoniumpersulfat	0,05%	0,067%	0,05%

**Tabelle 2:** Verwendete Gelkonzentrationen und Gelzusammensetzung

Der Elektrophoresepuffer bestand aus 1,44% Glycin, 0,3% Tris-Base und 0,1% SDS. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte ihr Transfer mittels Western-Blot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran, wofür mehrere Lagen Blot-Papier mit zwei Anodenlösungen (Zusammensetzung: Anodenlösung I: 0,3 mol/l Tris-Base, 0,01% Natriumazid und 20% (Vol:Vol) Methanol; Anodenlösung II: 25 mmol/l Tris-Base, 0,01% Natriumazid und 20% (Vol:Vol) Methanol) bzw. einer Kathodenlösung, bestehend aus 40 mmol/l Aminohexansäure, 0,01% SDS, 0,01% Natriumazid und 20% (Vol:Vol) Methanol, getränkt wurden. Nach dem Überführen der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte die Blockierung nicht mit Protein besetzter Membranareale mit 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) bestehend aus 0,242% Tris-Base, 0,8% Natriumchlorid und 0,5% (Vol:Vol) Polysorbat 20 (TWEEN). Für SERCA und Phospholamban wurde statt TBS eine Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,8% Kochsalz, 0,02% Kaliumchlorid, 0,024% Kaliumdihydrophosphat, 0,144% Dinatriumhydrogenphosphat und 0,5% (Vol:Vol) TWEEN verwendet. Zum Teil wurden die Membranen zerschnitten, um den einen Anteil mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper, den anderen Anteil mit einem gegen die als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Slots dienende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gerichteten

Antikörper inkubieren zu können. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden ersten Antikörper über Nacht. Der Antikörper wurde in dem Puffer, der zum Blockieren eingesetzt wurde gelöst (Verdünnungen siehe Tabelle 3). Nach dreimaliger Waschung der Membran in TBS bzw. PBS mit TWEEN (Zusammensetzung: siehe oben) erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden zweiten, mit Meerrettich-Peroxidase markierten Antikörper (siehe Tabelle 3), der ebenfalls in dem Blockierungspuffer gelöst wurde, über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Darstellung des Proteinsignals mittels Chemilumineszenz. Dazu wurden die ECLplus Western-Blot-Detektions-Reagenzien nach Angaben des Herstellers angewandt. Die Signale auf dem Chemilumineszenzfilm wurden densitometrisch mit Hilfe der ImageJ-Software für Windows ausgewertet. Die einzelnen Blots wurden entweder durch eine bei mehreren Blots aufgetragene Referenzprobe oder rechnerisch – durch Angleichung der Mittelwerte der aus den Signalen erhobenen Werte der verschiedenen Blots – aufeinander abgeglichen.

<b>Zielprotein</b>	<b>Verdünnung des ersten Antikörpers</b>	<b>Ursprungswirt des ersten Antikörpers</b>	<b>Verdünnung des zweiten Antikörpers</b>
SERCA2a	1:750	Maus	1:4000
Phospholamban	1:2000	Maus	1:10.000
Phospho-Serin-16-Phospholamban	1:5000	Kaninchen	1:2000
p44/42 MAPK	1:1000	Kaninchen	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1:1000	Kaninchen	1:1000
p 38 MAPK	1:1000	Kaninchen	1:1000
Phospho-p38 MAPK (pTpY180/182)	1:1000	Kaninchen	1:1000
GAPDH	1:10.000	Kaninchen	1:80.000

**Tabelle 3:** Verdünnung der primären und sekundären Antikörper zur immunochenmischen Proteindetektion

## 2.9. Isolation und Kultivierung von neonatalen Herzmuskelzellen

Neonatale, maximal 48 Stunden alte Wistar-Ratten (jeweils ca. 10 bis 30 Stück) wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen unmittelbar darauf entnommen und mit eiskalter, sterilgefilterter PBS-Glukose-Lösung (Zusammensetzung: 137 mmol/l Natriumchlorid, 2,68 mmol/l Kaliumchlorid, 8,3 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat, 1,47 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat und 20 mmol/l Glucose; pH 7,4) in eine Petrischale gegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten (bis auf wenige Ausnahmen wie z.B. die Zellzählung) unter keimfreien

Bedingungen in einer Sterilbank. Die Vorhöfe wurden von den Herzkammern getrennt und verworfen. Anschließend wurden die Ventrikel mit einer scharfen Schere fein zerkleinert, möglichst ohne das Gewebe dabei zu quetschen. Die Gewebestückchen wurden mehrfach mit eiskalter PBS-Glukose gewaschen, um anhaftende Blutreste zu entfernen. Es wurden 7 ml 37°C warme Kollagenase-Lösung, bei der es sich um die PBS-Glukose-Lösung, der 0,5 g pro 50 ml bovines Serumalbumin sowie rund 10.000 U Kollagenase Typ II zugesetzt wurde (pH 7,4), handelt, zu den Herzmuskelstückchen gegeben und das fest verschlossene Röhrchen ca. 5 Minuten im 37°C warmen Wasserbad sanft geschüttelt. Anschließend wurde nach einer kurzen Zeit, in der sich das Herzmuskelgewebe am Boden des Röhrchens absetzen konnte, der Überstand entfernt und unmittelbar mit 7 ml warmer „Stopp-Lösung“ - bestehend aus Zellkultur-Medium M199 mit Hanks Salzen und HEPES, dem zuvor 5µg/ml Gentamicin und 50 Einheiten/ml Penicillin zugesetzt wurden, und 5% (Vol:Vol) fetalem Kälberserum - gemischt, u.a. um durch im Kälberserum enthaltene Stoffe die Kollagenase zu inaktivieren. Zu dem Gewebe wurde erneut Kollagenase-Lösung gegeben usw. bis zum möglichst vollständigen Herauslösen der Kardiomyozyten aus ihrem Gewebeverband. Die Röhrchen mit den auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 700 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und die als Pellet vorliegenden Zellen mit 20 ml 37°C warmen Medium M199 mit Earls Salzen, HEPES und L-Glutamin, dem zuvor 5 µg/ml Gentamicin und 50 Einheiten/ml Penicillin zugesetzt wurden, und das 5% fetale Kälberserum sowie 10% Pferdeserum enthielt, resuspendiert. Die in Medium resuspendierten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> überführt und für ca. 50 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In diesem Zeitraum heftet sich der größte Teil der Fibroblasten im Gegensatz zu den in dieser Hinsicht langsameren Herzmuskelzellen an den Boden der Zellkulturschale. Danach wurde das Medium mit den noch darin enthaltenen Zellen wieder aus der Flasche entfernt und in ein Röhrchen gefüllt. 10 µl des Mediums wurden mit 10 µl Trypanblau gleichmäßig durchmischt, um Detritus, also abgestorbene Zellen und Zelltrümmer, durch Blaufärbung unter dem Mikroskop von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, indem in 4x4 Quadraten die lebenden Zellen gezählt wurden und der Mittelwert daraus mit 200.000 (10.000 x 20, da die Zellen in 20 ml resuspendiert

wurden) multipliziert wurde. Entsprechend der Zellkonzentration wurden die Zellen so auf zuvor mit 1%iger autoklavierter Gelatine-Lösung (1% Gelatine vom Schwein, gelöst in Aqua bidest.) vorbeschichtete Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm aufgeteilt, dass sich in jeder Schale ca. 1 Million lebende Zellen befand. Medium wurde ggf. so ergänzt, dass jede Schale 4 ml enthielt. Die Zellen wurden unter den oben genannten Konditionen im Inkubator gelagert.

Am Folgetag erfolgte ein Medienwechsel, bei dem nach Absaugen des Mediums und anschließendem kurzen Waschen mit einer handelsüblichen PBS-Dulbecco-Lösung mit Calcium und Magnesium je 4 ml Medium M199 mit Earls Salzen, HEPES und L-Glutamin (plus 5 µg/ml Gentamicin und 50 Einheiten/ml Penicillin), dem nur noch 1% fetales Kälberserum und 10% Pferdeserum beigemischt wurden, pro Schale auf die Zellen gegeben wurden. Weitere Medienwechsel, bei denen die Zusammensetzung des Mediums nicht weiter geändert wurde, erfolgten ggf. im 2-Tages-Abstand. Die Zellen wurden mindestens so lange wachsen gelassen, bis sich im mikroskopischen Bild ein sich rhythmisch kontrahierender Zellverband zeigte (ca. 3 bis 7 Tage).

## **2.10. Ermittlung des Gehaltes an Fibroblasten in der Herzmuskelzellkultur mittels Immunhistologie**

Da für Versuche an neonatalen Kardiomyozyten nur Kulturen verwendet werden sollen, die nicht mehr als fünf Prozent Fibroblasten enthalten, und die Zeitspanne, in der sich die Fibroblasten anheften (s.o.) bei Zellkulturflaschen unterschiedlicher Hersteller variiert, muss die optimale Inkubationsdauer der frisch isolierten Zellen zum Trennen der Fibroblasten von den Herzmuskelzellen ausgetestet werden. Dazu wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (20-60 Minuten, 5-Minuten-Abstände) die im Überstand in der Zellkulturflasche befindlichen Zellen entnommen, gezählt und so in 24-well-Zellkulturplatten ausplattiert, dass jede Vertiefung in der Platte ca. 100.000 bis 150.000 lebende Zellen enthielt und von jeder Inkubationsdauer mindestens 3 Proben vorhanden waren. In die Vertiefungen der Zellkulturplatte wurden zuvor runde Deckgläschen gelegt und diese mit 1%iger Gelatine-Lösung (s.o.) vorbeschichtet. Nach einer drei- bis viertägigen Inkubationszeit, in der Medienwechsel wie bei den in Schalen ausplattierten Zellen

erfolgten (s.o.), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, und unmittelbar nach Entfernen des PBS wurden 300 µl 3,7%ige Formaldehyd-Lösung, neutral gepuffert nach Lillie, in jede Vertiefung gegeben. Die Zellen wurden so während einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur fixiert. Die Formaldehyd-Lösung, neutral gepuffert nach Lillie, wird folgendermaßen angesetzt: 22,5 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) und 40,5 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) werden mit 500 ml 3,7%iger Formaldehyd-Lösung gemischt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Nach entfernen der Formaldehyd-Lösung wurden die Zellen vier Mal mit PBS gewaschen. Es folgten ein Waschschrift mit 0,1 M PBS (14,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 2,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 8,766 g/l Natriumchlorid, pH 7,4) und mehrere Waschschriften mit 0,05 M TBS (Tris-gepufferte Salzlösung). Der Trispuffer war aus 6,057 g/l Trishydroxymethyl-aminomethan und 8,766 g/l NaCl zusammengesetzt (pH 7,6). Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit einer Mischung aus 20 ml Methanol und 5 ml 3%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer 20minütigen Einwirkzeit blockiert. Nach weiteren Waschschriften mit 0,05 M TBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit einer Lösung, die 0,59 g Ammoniumchlorid und 50 µl Triton X in 20 ml der 0,05 M TBS enthielt, inkubiert. Es folgte nach erneutem mehrmaligem Waschen mit 0,05 M TBS die 60 Minuten dauernde Blockierung unspezifischer Antigen-Bindungsstellen mit 5%iger BSA-Lösung (1 g bovines Serum-Albumin gelöst in 20 ml der 0,05 M TBS-Lösung). Darauf folgte nach Absaugen der Lösung die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Der gegen die in Fibroblasten vorkommende Prolyl-4-Hydroxylase gerichtete Antikörper wurde dazu in einer Verdünnung von 1:50 in 0,8%ige BSA-Lösung (2,4 ml der zuvor hergestellten 5%igen BSA-Lösung mit 0,05 M TBS auf 15 ml aufgefüllt) gegeben. Am Folgetag wurden die Zellen nach Absaugen der überschüssigen Antikörper-Lösung und mehreren Waschschriften mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Maus) in einer Verdünnung von 1:400 in 0,05 M TBS inkubiert. Dies dauerte eine Stunde und erfolgte bei Raumtemperatur. Nach erneutem Absaugen der Lösung und mehrmaligem Waschen wurde eine 1:150 verdünnte Meerrettich-Peroxidase-Lösung (in 0,05 M TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben, um zu bewirken, dass sich die Meerrettich-Peroxidase an den biotinylierten sekundären Antikörper bindet. Es folgten wieder mehrere Waschschriften, nach denen für 30 Minuten eine Lösung von 7,5 mg



Diaminobenzidin, 6,0 mg Ammoniumchlorid, 0,05 mol Nickel-II-Sulfat, 300 µl 10%ige wässrige Glucose-Lösung und 60 µg Glucose-Oxidase in 15 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) (filtriert) zu den Zellen gegeben wurde. Der Phosphatpuffer bestand aus 14,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 2,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat. Die in diesem Zeitraum ablaufende Reaktion wurde mit 0,05 M TBS abgestoppt. Die Zellen wurden zum letzten Mal dreimal in Folge mit 0,05 M TBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit den anhaftenden Zellen jeweils für zwei Minuten in Ethanol in ansteigender Konzentration (70%, 96%, 100%) und schließlich in Xylol getaucht und danach mit einem vom Hersteller als „Aqua Poly/Mount“ bezeichneten „Spezialklebstoff“ eingedeckelt. Die Fibroblasten stellten sich nun im mikroskopischen Bild durch die in ihnen enthaltene Prolyl-Hydroxylase schwarz eingefärbt dar, wohingegen die Herzmuskelzellen ungefärbt blieben. Von jedem Deckgläschen wurden an mindestens drei verschiedenen Stellen jeweils 100 Zellen ausgezählt und ermittelt, bei wie vielen davon es sich um Fibroblasten handelt.

## **2.11. Stimulation der Zellen und Proteinisolation aus den Zellkultur-Proben**

Bei jeweils mindestens zwei Zellpopulationen wurde  $10^{-6}$  mol/l Atorvastatin in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst dem Medium zugesetzt und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde mindestens eine davon entweder mit TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 2 ng/ml oder mit  $10^{-7}$  mol/l Ang II stimuliert. Dem Medium in der anderen Zellkulturschale wurde das auch zum Waschen der Zellen verwendete PBS (s.o.), das auch als Lösungsmittel für Ang II und TNF $\alpha$  diente, als Placebo zugefügt. Ebenso wurden die Zellen mindestens einer weiteren, nicht mit Atorvastatin vorbehandelten Zellpopulation mit TNF $\alpha$  resp. Ang II in der oben genannten Konzentration stimuliert. Zu weiteren unbehandelten Zellen wurde wiederum PBS ins Medium gegeben. Bei einzelnen Versuchen wurde auch eine „Kontrollgruppe“ mit DMSO ohne Atorvastatin „eingerrichtet“. Nach einer Inkubationsdauer von je fünf Minuten wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen, das PBS wurde ebenfalls abgesaugt, und anschließend wurde je nach Bewuchsdichte der Zellkultur 300 bis 500 µl Lysispuffer in jede Schale gegeben. Dieser enthielt 50 mmol/l HEPES, 150 mmol/l Natriumchlorid, 10% (Vol:Vol)

Glycerol, 1,5mmol/ Magnesiumchlorid, 1mmol/l EGTA, 1% (Vol:Vol) Triton X, 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 0,25 mmol/l Natriumorthovanadat, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 100 mmol/l Natriumfluorid, je 10 µg/ml Leupeptin und Aprotinin, sowie 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schale abgelöst, mit dem Puffer in ein 1,5 ml Reagiergefäß mit Schraubdeckel überführt und durch kräftiges Schütteln auf einem „Minishaker“ und mehrmaliges Aufziehen und Herausspritzen durch eine feine Kanüle (26 G) mit Hilfe einer 1-ml-Spritze homogenisiert. Ein kleiner Teil der jeweiligen so entstandenen Probe wurde für die photometrische Protein-Konzentrationsbestimmung zurückbehalten, der Rest in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung im Western-Blot bei –80°C gelagert.

## **2.12. Statistik**

Die statistische Überprüfung der Messwerte aus den verschiedenen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu prüfen, erfolgte zuerst eine Varianzanalyse (ANOVA). Bei  $p < 0,05$  wurden Gruppenunterschiede mit dem T-Test für unabhängige Stichproben geprüft. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ . Alle Werte in der vorliegenden Arbeit sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of measurement) angegeben.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Effekte von HMGCoA-Reduktasehemmern auf den kardialen Phänotyp**

Um zu untersuchen, ob sich eine Hemmung der HMGCoA-Reduktase abschwächend auf die Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie und einer kontraktile Dysfunktion bei Renin-transgenen Ratten auswirkt, wurden zwölf Tiere von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche mit dem lipophilen HMGCoA-Reduktasehemmer Atorvastatin in einer Dosierung von 30 mg pro kg Körpergewicht mittels Gavage (orale Gabe durch eine in den Ösophagus eingeführte Knopfkanüle) behandelt. Nach der Behandlungsphase wurden Körper- und Herzgewicht, Herzgröße, kontraktile Funktion sowie Kollagengehalt des Herzens ermittelt.

##### **3.1.1. Körpergewicht und Herzgewicht**

Die Auswirkung einer Behandlung mit Atorvastatin auf das Gewicht des Körpers und des linken Ventrikels von zwölf Wochen alten Renin-transgenen Ratten ist in Tabelle 4 dargestellt.

	<b>SD Kontrolle (n=10)</b>	<b>SD Atorvastatin (n=10)</b>	<b>TG Kontrolle (n=10)</b>	<b>TG Atorvastatin (n=12)</b>
<b>Körpergewicht (g)</b>	401,2 ± 12,0	387,0 ± 6,4	320,6 ± 20,3*	362,7 ± 9,3**
<b>LV-Gewicht (mg)</b>	1075,7 ± 44,6	969,0 ± 37,5	1339,7 ± 49,9***	1382,5 ± 36,0 <sup>+</sup>
<b>LV-Gewicht/ Körpergewicht (mg/g)</b>	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	4,3 ± 0,2 <sup>+</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>++</sup>
<b>RV-Gewicht (mg)</b>	213,5 ± 12,2	224,0 ± 15,6	199,4 ± 9,2	202,7 ± 7,4
<b>RV-Gewicht/ Körpergewicht (mg/g)</b>	0,5 ± 0,03	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,04	0,6 ± 0,03

**Tabelle 4:** Körpergewicht, absolutes und relatives Gewicht der linken (LV) bzw. rechten Herzkammer (RV) bei zwölf Wochen alten Renin-transgenen Ratten (TG(mRen2)27, TG) und Kontrolltieren (Sprague-Dawley-Ratten, SD) mit und ohne vorhergehender sechswöchiger Behandlung mit Atorvastatin. \*= $p < 0,01$  vs. SD Kontrolle und SD Atorvastatin, \*\*= $p < 0,05$  vs. SD Kontrolle, \*\*\*= $p = 0,001$  vs. SD Kontrolle und  $p < 0,001$  vs. SD Atorvastatin, += $p < 0,001$  vs. SD Kontrolle und SD Atorvastatin, ++= $p < 0,05$  vs. TG Kontrolle

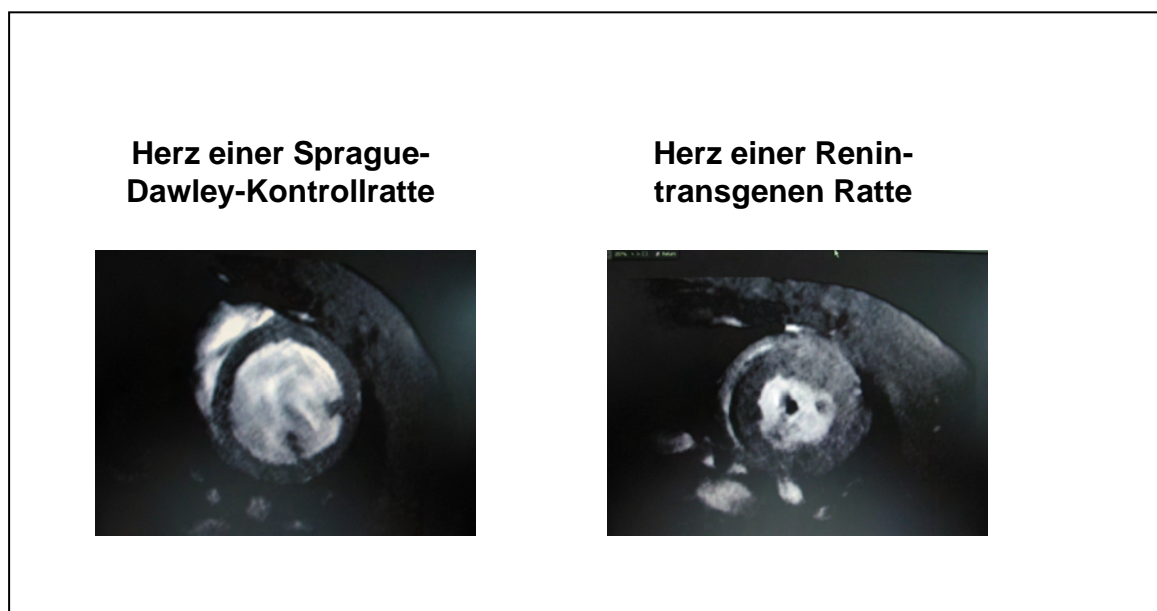
Die nur mit Placebo behandelten transgenen Ratten blieben im Wachstum gegenüber den anderen Gruppen deutlich zurück. Die beiden Gruppen mit Kontrolltieren zeigten zwar einen Gewichtsunterschied, der allerdings statistisch signifikant nicht war. Durch die Gabe des Atorvastatins schien es zu einer Zunahme des Körpergewichts der transgenen Ratten im Vergleich zu ihren unbehandelten Altersgenossen gekommen zu sein, auch wenn diese Tiere nicht das Gewicht der genetisch unveränderten Tiere erreichten.

Das absolute Gewicht der linken Herzkammer unterschied sich zwischen den beiden Gruppen der transgenen Ratten nicht signifikant und lag grob gerundet etwa 300 mg oberhalb des Gewichts der linken Ventrikel der beiden Sprague-Dawley-Ratten-Gruppen. Dieser Unterschied wurde durch Berücksichtigung des erheblich niedrigeren Körpergewichts der unbehandelten transgenen Ratten, also den

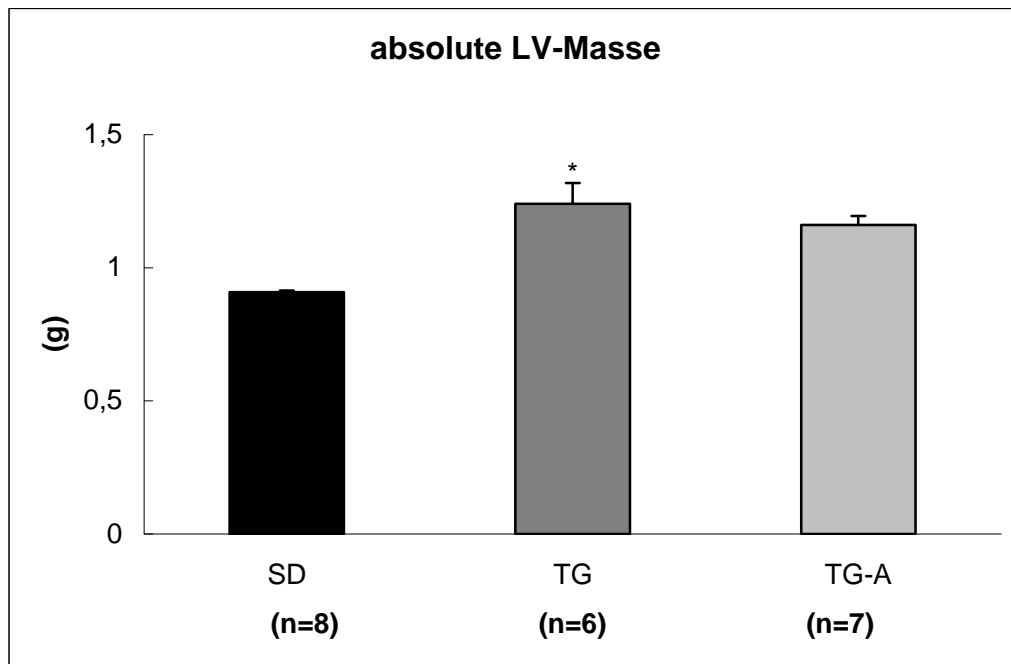
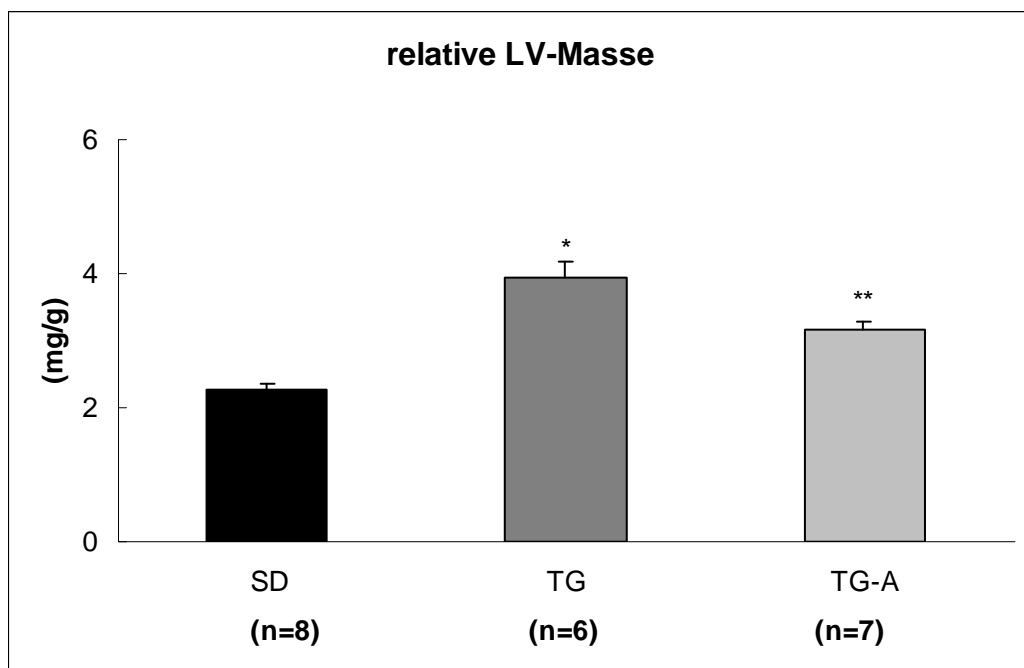
Vergleich des relativen Gewichts der linken Ventrikel, deutlicher. Dieser Parameter wurde insofern durch das Atorvastatin beeinflusst, als das relative Gewicht der linken Herzkammern der behandelten transgenen Tiere deutlicher unter dem der unbehandelten transgenen lag, als der Unterschied dieses Parameters zwischen den beiden Kontrolltiergruppen war. Die Gewichtsverhältnisse der rechten Herzkammern wurden weder durch die genetische Veränderung noch durch die Atorvastatin-Gabe nennenswert beeinflusst.

### **3.1.2. Magnetresonanztomographische Untersuchungsbefunde**

Die magnetresonanztomographische Untersuchung der Herzen von Renin-transgenen und Kontrollratten im Alter von zwölf Wochen bestätigte, dass durch die Auswirkungen des Transgens eine Zunahme der linksventrikulären Masse verursacht wurde (Abbildung 4 und 5). Die ermittelten Werte der transgenen Ratten und der Sprague-Dawley-Kontrollratten unterschieden sich statistisch hochsignifikant voneinander, sowohl in Bezug auf die absolute als auch auf die – auf das deutlich unterschiedliche Körpergewicht der Tiere bezogenen – relativen Masse. Dieser Unterschied wurde durch die Therapie mit Atorvastatin bei der absoluten Masse nur geringfügig, bei der relativen Masse, wenn auch nur zum Teil, so doch statistisch signifikant, aufgehoben (Abbildung 5).

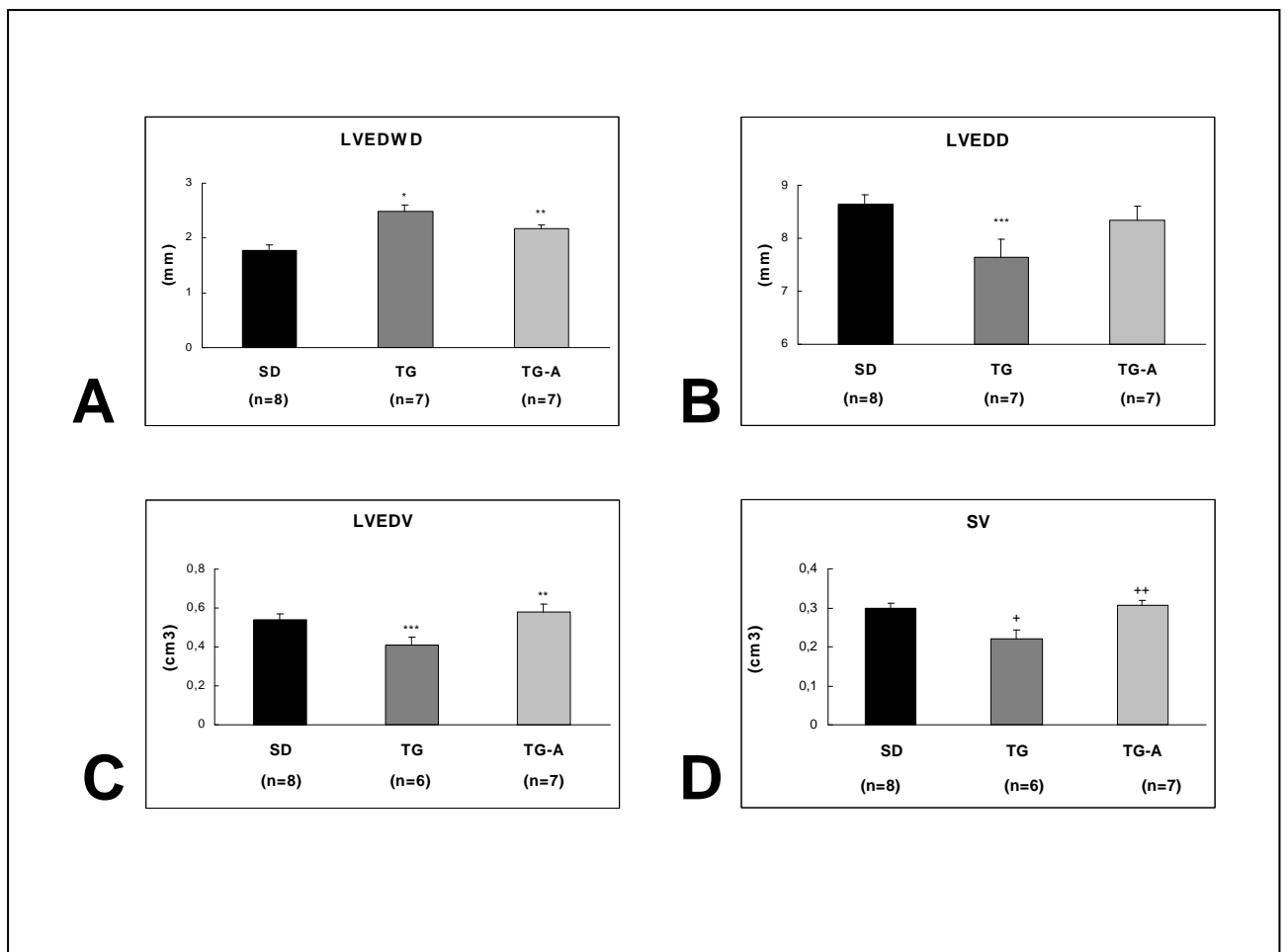


**Abbildung 4:** Repräsentative enddiastolische magnetresonanztomographische Darstellungen des linken Ventrikels im Querschnitt auf Papillarmuskelhöhe einer zwölf Wochen alten Renin-transgenen Ratte und einer altersgleichen Sprague-Dawley-Kontrollratte.

**A****B**

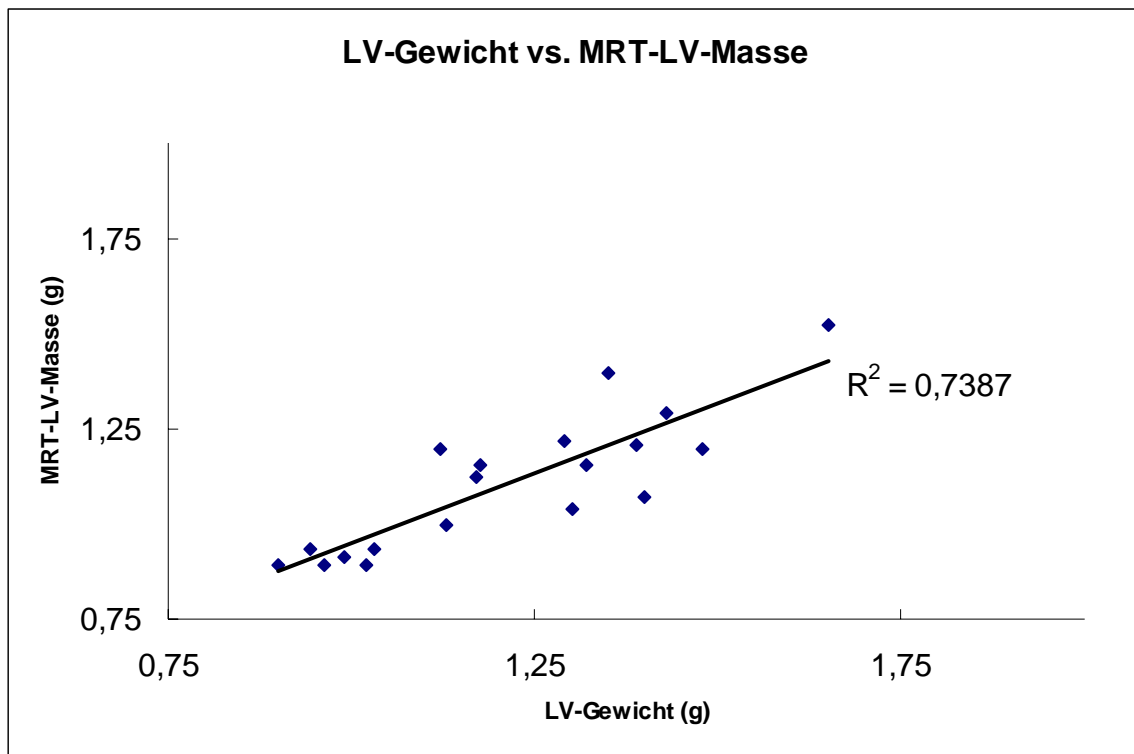
**Abbildung 5:** Ergebnis der kardiomagnetresonanztomographischen Bestimmung der absoluten (A) und relativen (B) Masse des linken Ventrikels von zwölf Wochen alten Renin-transgenen Ratten (TG), Renin-transgenen Ratten nach einer sechswöchigen Behandlungsphase mit Atorvastatin (TG-A) und altersgleichen Sprague-Dawley-Kontrollratten (SD). \*= $p < 0,001$  vs. SD \*\*= $p < 0,05$  vs. TG

Dementsprechend waren auch die Parameter enddiastolische linksventrikuläre Wanddicke und enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser sowie enddiastolisches linksventrikuläres Volumen und Schlagvolumen dahingehend verändert, dass die Wanddicke bei den transgenen Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren zugenommen, die übrigen Parameter abgenommen hatten (Abbildung 6). Die Behandlung der Renin-transgenen Ratten mit Atorvastatin führte zu einer Angleichung der oben genannten Parameter an die Werte der Kontrolltiere, aber nicht zu ihrer vollständigen Normalisierung.



**Abbildung 6:** Einfluss einer sechswöchigen Therapie mit Atorvastatin auf die enddiastolische linksventrikuläre Wanddicke (LVEDWD, A), den enddiastolischen linksventrikulären Durchmesser (LVEDD, B), das enddiastolische linksventrikuläre Volumen (LVEDV, C) und das Schlagvolumen (SV, D) von Renin-transgenen Ratten. Die Abbildungen zeigen die Resultate der kardiomagnetresonanztomographischen Ermittlung dieser Parameter. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*= $p=0,001$  vs. SD, \*\*= $p<0,05$  vs. TG, \*\*\*= $p<0,05$  vs. SD, += $p<0,01$  vs. SD, ++= $p<0,01$  vs. TG

Die Ergebnisse der magnetresonanztomographischen Ermittlung der linksventrikulären Masse und die mittels Wiegen festgestellten linksventrikulären Gewichte korrelierten in hohem Maße miteinander. Die durch Wiegen ermittelten Werte lagen in der Regel etwas über den berechneten.

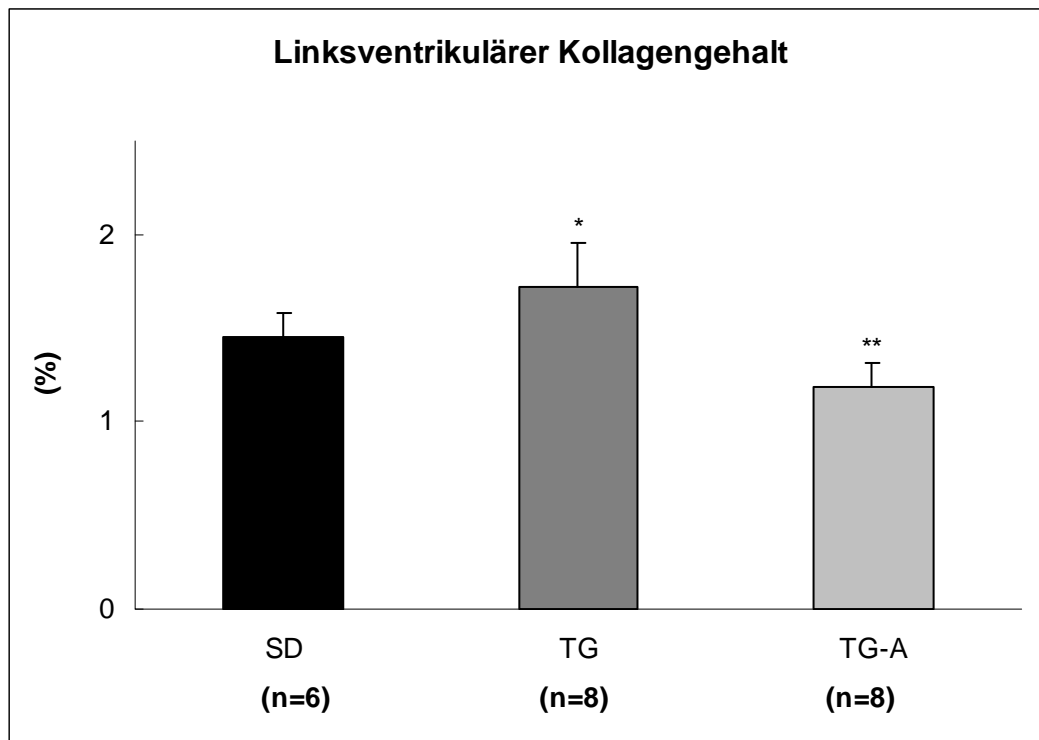


**Abbildung 7:** Korrelation von durch kardiale Magnetresonanztomographie berechneter Masse und mittels Waage ermitteltem Gewicht des linken Ventrikels bei zwölf Wochen alten Renin-transgenen und Sprague-Dawley-Kontrollratten.

### 3.1.3. Myokardialer Kollagengehalt

Die Myokardhypertrophie bei den zwölf Wochen alten Renin-transgenen Ratten war von einem Anstieg des myokardialen Kollagengehalts im Vergleich zu den Kontrolltieren begleitet. Durch die Behandlung mit Atorvastatin wurde die Zunahme des myokardialen Kollagengehalts verhindert (Abbildung 8).





**Abbildung 8:** Linksventrikulärer Kollagengehalt bei Renin-transgenen Ratten im Alter von acht Wochen mit und ohne sechswöchige Atorvastatintherapie. Das Säulendiagramm gibt die statistischen Mittelwerte für die mittels Computeranalyse quantifizierten Kollagengehalte wieder. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*= $p < 0,05$  vs. SD, \*\*= $p < 0,05$  vs. TG

## 3.2. Millar-Katheter-Messungen

### 3.2.1. Blutdruck und Herzfrequenz

Die mittels Millar-Katheter *in vivo* erhobenen Werte für den systolischen Blutdruck und die Herzfrequenz sind in Tabelle 5 angegeben. Der systolische Blutdruck war bei den Renin-transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollratten signifikant erhöht. Die Therapie mit Atorvastatin wirkte sich nicht auf den arteriellen Blutdruck aus. Ebenfalls beeinflusste die Atorvastatin-Therapie die Herzfrequenz unter Anästhesie nicht.

	<b>SD (n=5)</b>	<b>TG (n=4)</b>	<b>TG-A (n=7)</b>
<b>RRsys</b>	115 ± 10	147 ± 2*	155 ± 2**
<b>Herzfrequenz</b>	431 ± 26	424 ± 28	425 ± 17

**Tabelle 5:** systolischer Blutdruck und Herzfrequenz von zwölf Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten (SD), Renin-transgenen Ratten (TG) und transgenen Ratten mit vorhergehender sechswöchiger Behandlung mit Atorvastatin (TG-A). \*= $p < 0,05$  vs. SD, \*\*= $p < 0,001$  vs. SD

### 3.2.2. Linksventrikuläre kontraktile Funktion

Die Bestimmung der linksventrikulären Relaxationsgeschwindigkeit mittels Millar-Katheter-Untersuchung zeigte eine Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit bei den transgenen Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Durch die Behandlung mit Atorvastatin kam es zu einer statistisch signifikanten Heraufregulation dieses Parameters (Tabelle 6).

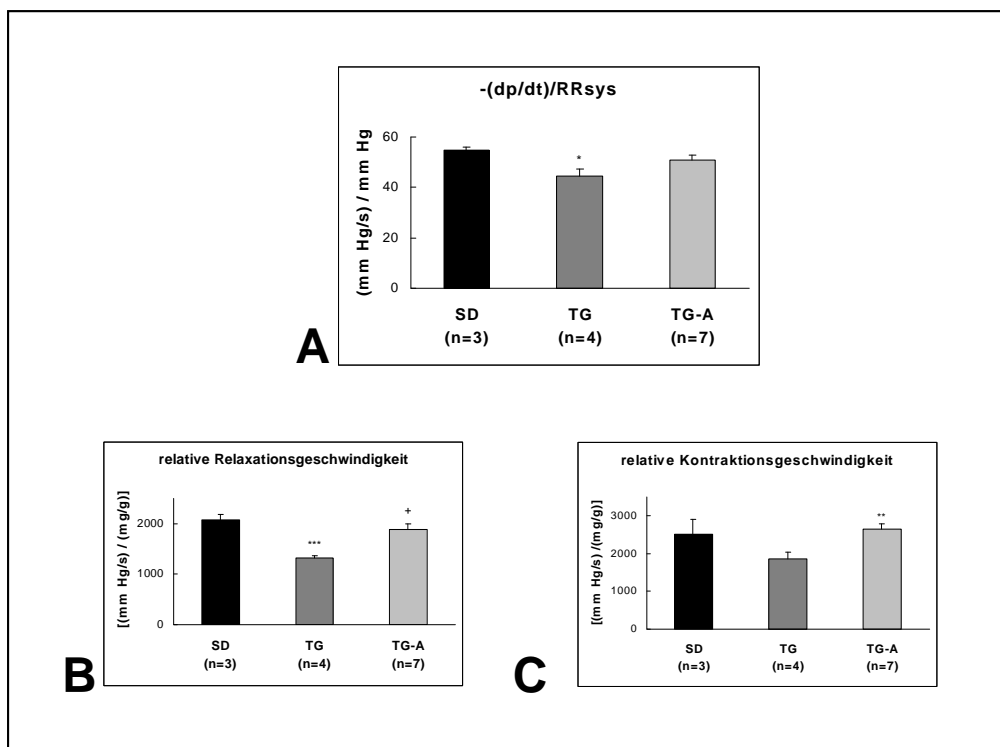
	<b>SD (n=3)</b>	<b>TG (n=4)</b>	<b>TG-A (n=7)</b>
<b>+dp/dt (mmHg/s)</b>	7628 ± 1277	8270 ± 996	10811 ± 553
<b>-dp/dt (mmHg/s)</b>	6264 ± 146	5826 ± 366	7679 ± 403*
<b>+(dp/dt)/RRsys</b>	65,77 ± 8,92	62,58 ± 7,50	72,37 ± 4,22
<b>-(dp/dt)/RRsys</b>	54,74 ± 1,59	44,38 ± 2,71**	50,94 ± 1,79

**Tabelle 6:** Einfluss einer sechswöchigen Therapie mit Atorvastatin auf die linksventrikuläre Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit. -dp/dt bedeutet linksventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit, +dp/dt linksventrikuläre Kontraktionsgeschwindigkeit, -(dp/dt)/RRsys bzw. +(dp/dt)/RRsys stehen für die entsprechenden Parameter bezogen auf den systolischen Blutdruck. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*= $p < 0,05$  vs. TG \*\*= $p < 0,05$  vs. SD

Bezogen auf den erhöhten systolischen Blutdruck der transgenen Ratten wurde der Unterschied dieses Parameters zwischen den Kontrolltieren und den Renin-transgenen Tieren deutlicher (Tabelle 6, Abbildung 9). Die Kontraktionsgeschwindigkeit war bei den unbehandelten Renin-transgenen Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren lediglich im Trend und bezogen auf den

systolischen Blutdruck reduziert. Auch dieser Parameter wurde jedoch durch die Behandlung mit Atorvastatin gesteigert.

Um das deutlich unterschiedliche Herz- und Körpergewicht der Tiere in den einzelnen Gruppen zu berücksichtigen, wurde die relative Relaxations- bzw. Kontraktionsgeschwindigkeit berechnet, indem die Relaxations- bzw. Kontraktionsgeschwindigkeit auf das relative Herzgewicht bezogen wurde. Hier zeigte sich ebenfalls eine Herabregulation der relativen Kontraktionsgeschwindigkeit bei den transgenen Ratten, die durch die sechswöchige Atorvastatin-Gabe statistisch signifikant verhindert wurde. Die relative Relaxationsgeschwindigkeit war bei den Renin-transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren sehr deutlich vermindert, was durch die Behandlung mit Atorvastatin nahezu vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 9).

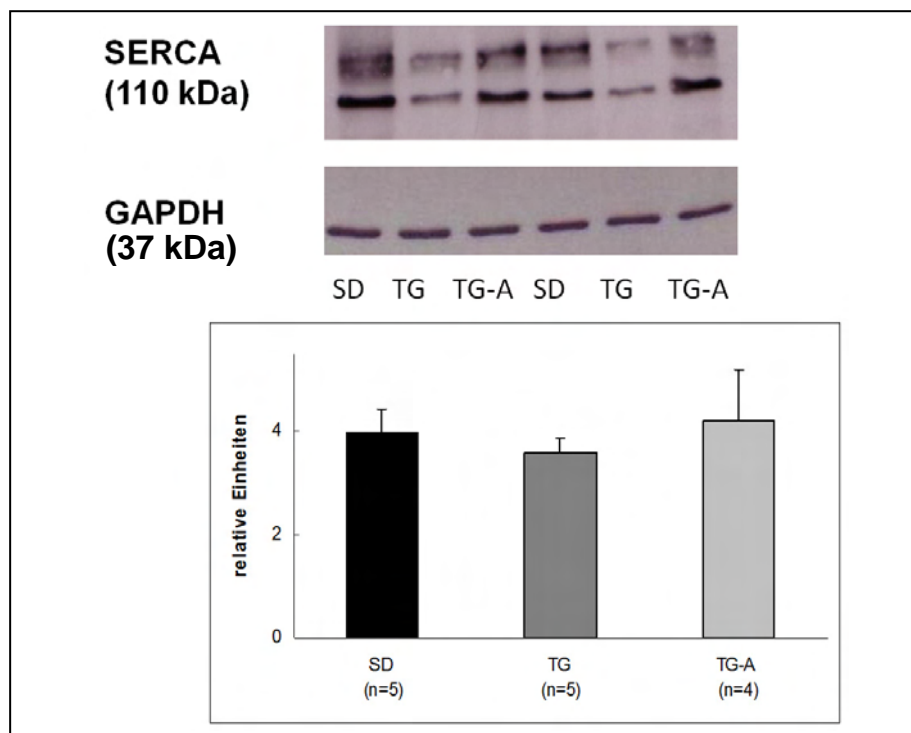


**Abbildung 9:** Beeinflussung der auf den systolischen Blutdruck bezogenen Relaxationsgeschwindigkeit ( $-(dp/dt)/RR_{sys}$ ), A) sowie der relativen Relaxations- (B) und Kontraktionsgeschwindigkeit (C) von Renin-transgenen Ratten durch eine sechswöchige Therapie mit Atorvastatin. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*=p=0,05 vs. SD, \*\*=p<0,01 vs.TG, \*\*\*=p<0,001 vs. SD, +=p<0,01 vs. TG

### 3.3. Kalzium-Homöostase regulierende Proteine

#### 3.3.1. Sarko(endo)plasmatische-Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

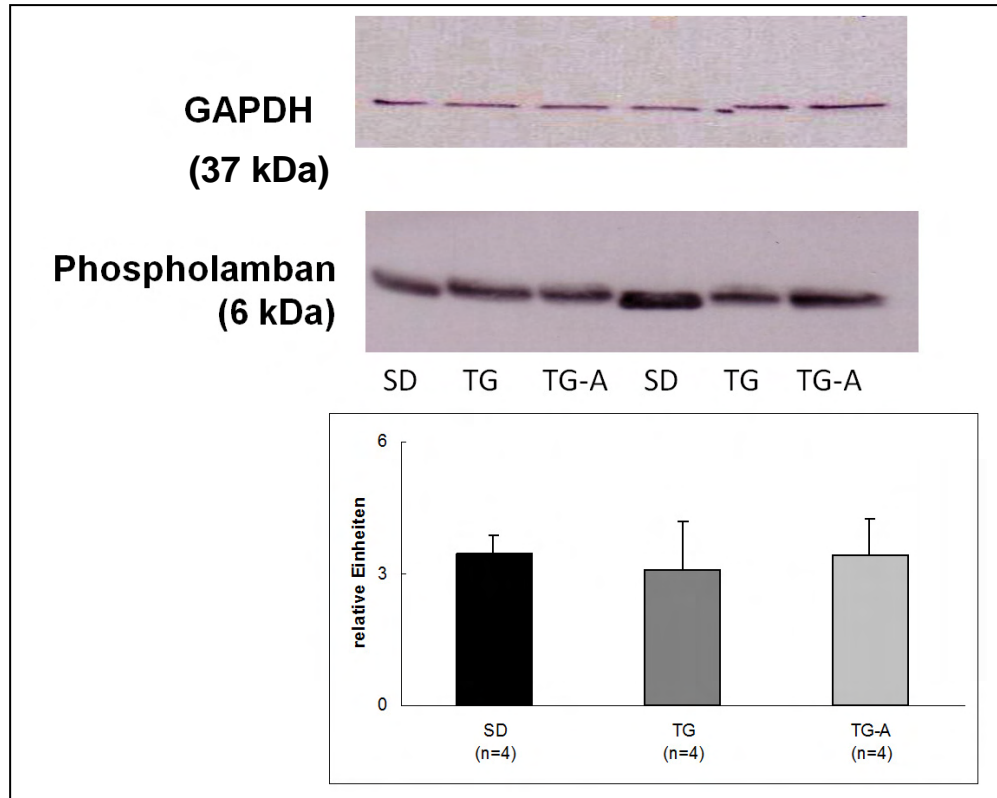
Die Western-Blot-Untersuchung zur Quantifizierung des linksventrikulären myokardialen Proteingehalts der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Isoform 2a) (SERCA 2a) zeigte eine Doppelbande auf der erwarteten Höhe entsprechend einem Molekulargewicht von 110 kDa. Es stellte sich bei den transgenen Ratten eine geringe Herabregulation des Gehalts an SERCA2a im Vergleich zu den Kontrolltieren dar sowie durch die Atorvastatin-Behandlung eine Normalisierung des SERCA2a-Proteingehalts. Diese Effekte waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Einfluss einer Therapie mit Atorvastatin von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche auf den linksventrikulären myokardialen Gehalt an SERCA2a bei Renin-transgenen Ratten. Im oberen Teil der Abbildung ist ein repräsentativer Original-Western-Blot zu sehen, im unteren Teil die statistischen Mittelwerte für die einzelnen Gruppen nach Auswertung der immunochemischen Signale in Relation zu den immunochemischen Signalen der als Beladungskontrolle dienenden GAPDH. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung.

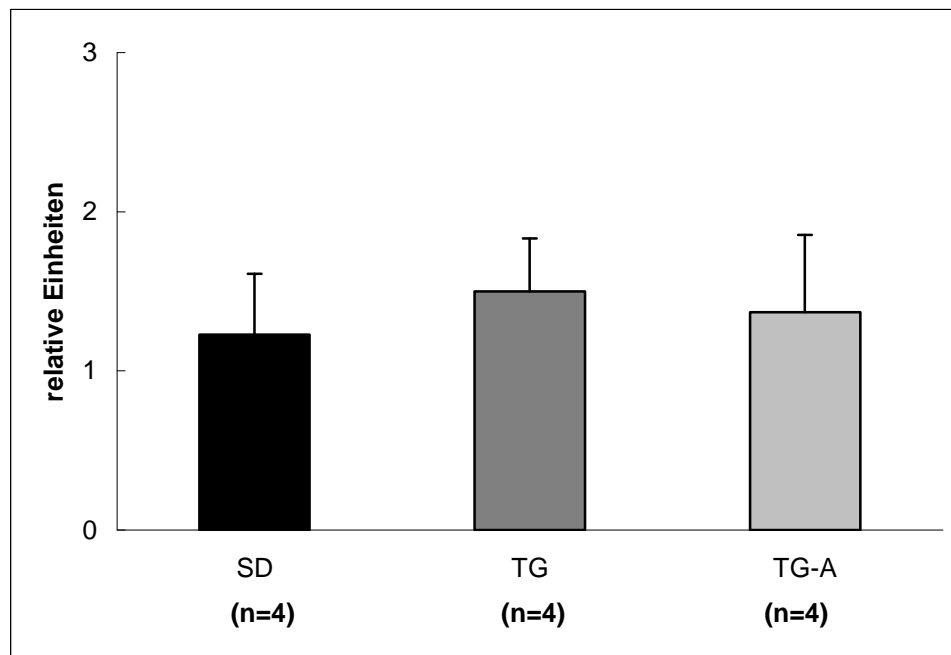
### 3.3.2. Phospholamban

Keine Herabregulation fand sich bei den transgenen Ratten für Phospholamban. Das entsprechende Signal zeigte sich im Western-Blot auf einer Höhe entsprechend einem Molekulargewicht von 6 kDa für die monomere Form. Atorvastatin hatte keinen Einfluss auf den Phospholamban-Proteingehalt (Abbildung 11).



**Abbildung11:** Linksventrikulärer myokardialer Gehalt an Phospholamban bei Renin-transgenen Ratten ohne und nach sechswöchiger Atorvastatin-Behandlung sowie bei Sprague-Dawley-Kontrollratten. Im oberen Teil der Abbildung ist ein repräsentativer Original-Western-Blot zu sehen. Der untere Teil zeigt die statistischen Mittelwerte für die einzelnen Gruppen nach Auswertung der immunochemischen Signale in Relation zu den Signalen der als Ladekontrolle dienenden GAPDH. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung.

Ebenfalls blieb der Phosphorylierungsgrad des Phospholambans am Serinrest 16 sowohl durch die Transgenexpression als auch durch die Atorvastatin-Gabe unbeeinflusst. Hier zeigte sich das entsprechende Signal im Western-Blot auf einer Höhe entsprechend einem Molekulargewicht von rund 25 kDa für die pentamere Form (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Linksventrikulärer myokardialer Gehalt an Phospho-Serin 16-Phospholamban bei Renin-transgenen Ratten ohne und nach sechswöchiger Atorvastatin-Behandlung sowie bei Sprague-Dawley- Kontrollratten. Die Abbildung zeigt die statistischen Mittelwerte für die einzelnen Gruppen nach Auswertung der immunochemischen Signale in Relation zu den immunochemischen Signalen der als Beladungskontrolle dienenden GAPDH. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung.

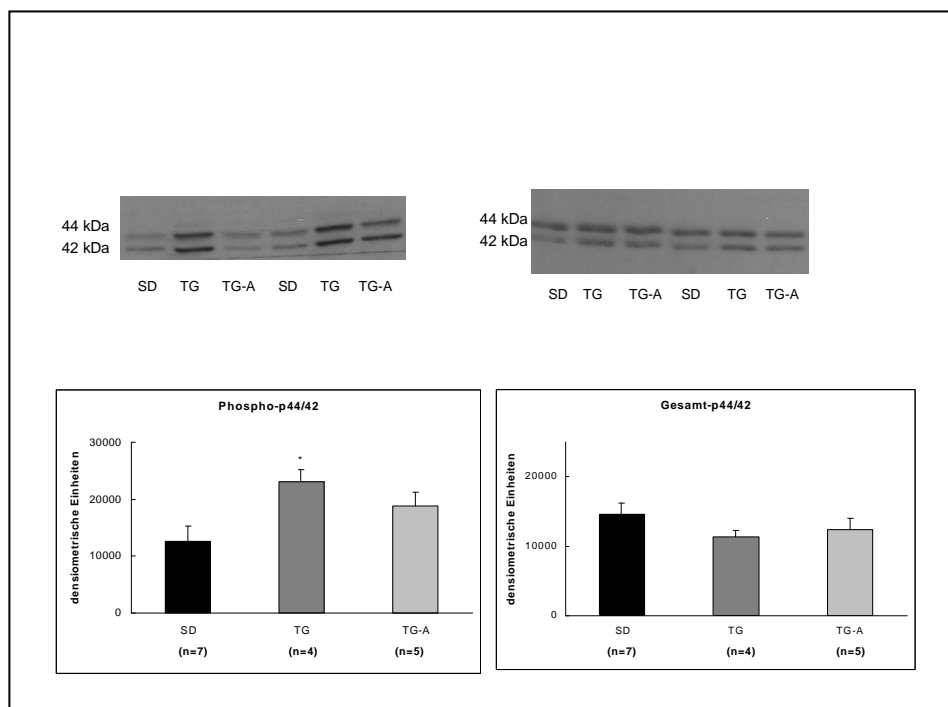
### 3.4. In-Vivo-Untersuchung des Einflusses von Atorvastatin auf die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38

Aus dem Herzmuskelgewebe der oben beschriebenen Ratten wurde nach einem anderen Verfahren und mit einer anders zusammengesetzten Pufferlösung erneut eine Proteinlösung gewonnen, die in der anschließenden Western-Blot-Analyse eingesetzt wurde. Bei diesen Western-Blot-Untersuchungen sollte eine Quantifizierung der phosphorylierten und damit aktivierten Form der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) p44/42 und p38 erfolgen. Es zeigten sich immunochemische Signale als (Doppel-) Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 44 kDa und 42 kDa resp. 38 kDa. Die entsprechenden Western-Blots wurden ein zweites Mal unter Verwendung eines gegen das Gesamt-p44/42 bzw. -p38 gerichteten Antikörpers durchgeführt. Hier blieb die Proteinmenge der beiden MAP-Kinasen im Gruppenvergleich identisch. Lediglich der

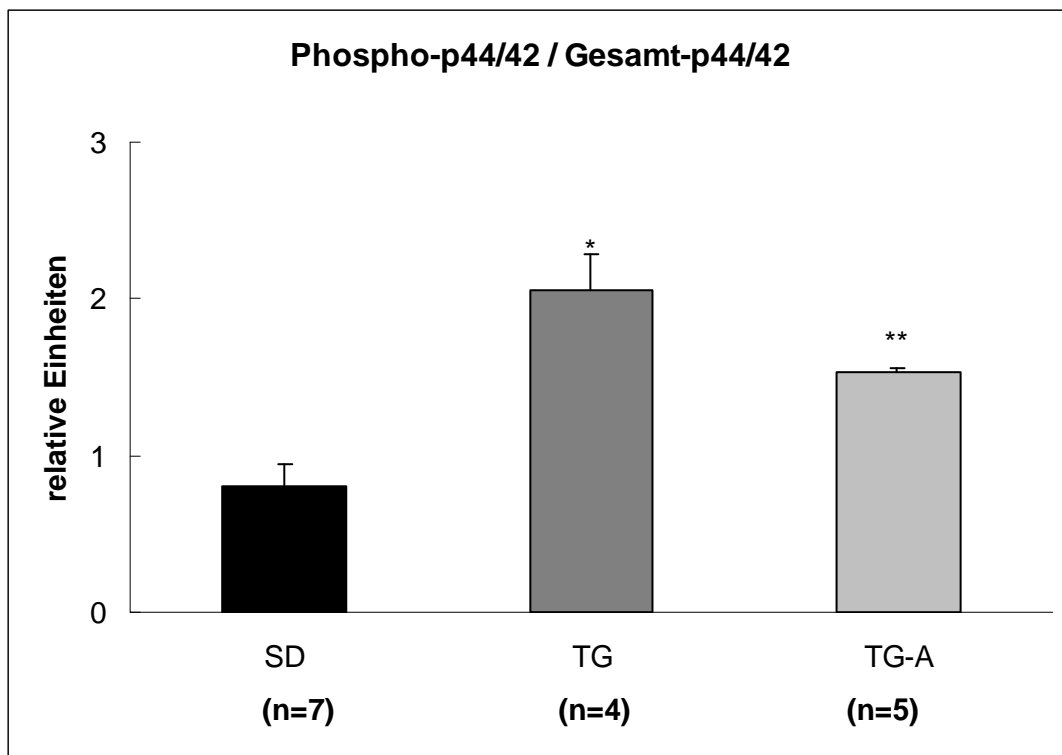
Phosphorylierungsgrad war unterschiedlich (Abbildung 13 und 15). Aufgrund dessen wurden die Gesamt-p44/42- bzw. -p38-Banden zur Überprüfung, ob jeweils die gleiche Menge an Gesamtprotein aufgetragen wurde, verwendet. Da das Chemilumineszenzsignal der GAPDH eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 37 kDa zeigt, konnte es hier als Ladekontrolle auf derselben Membran nicht eingesetzt werden.

### 3.4.1. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42

Wie in Abbildung 13 und 14 ersichtlich kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Phosphorylierung der p44/42-MAP-Kinasen bei den transgenen Ratten, die kein Atorvastatin erhalten hatten. Dieser Effekt wurde durch die Therapie mit Atorvastatin signifikant vermindert. Setzt man die phosphorylierte Form dieser MAP-Kinasen in Relation zu der Gesamtform, um mögliche Unterschiede in der Beladung der einzelnen Slots zu nivellieren, tritt dieser Effekt noch etwas deutlicher hervor (Abbildung 14).



**Abbildung 13:** Einfluss einer sechswöchigen Atorvastatintherapie Renin-transgener Ratten auf den Aktivierungszustand der MAP-Kinasen p44/42. Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative Original-Western-Blots, die Säulendiagramme im unteren Teil die statistischen Mittelwerte für die einzelnen Gruppen nach densitometrischer Auswertung der immunochemischen Signale. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*=  $p < 0,05$  vs. SD

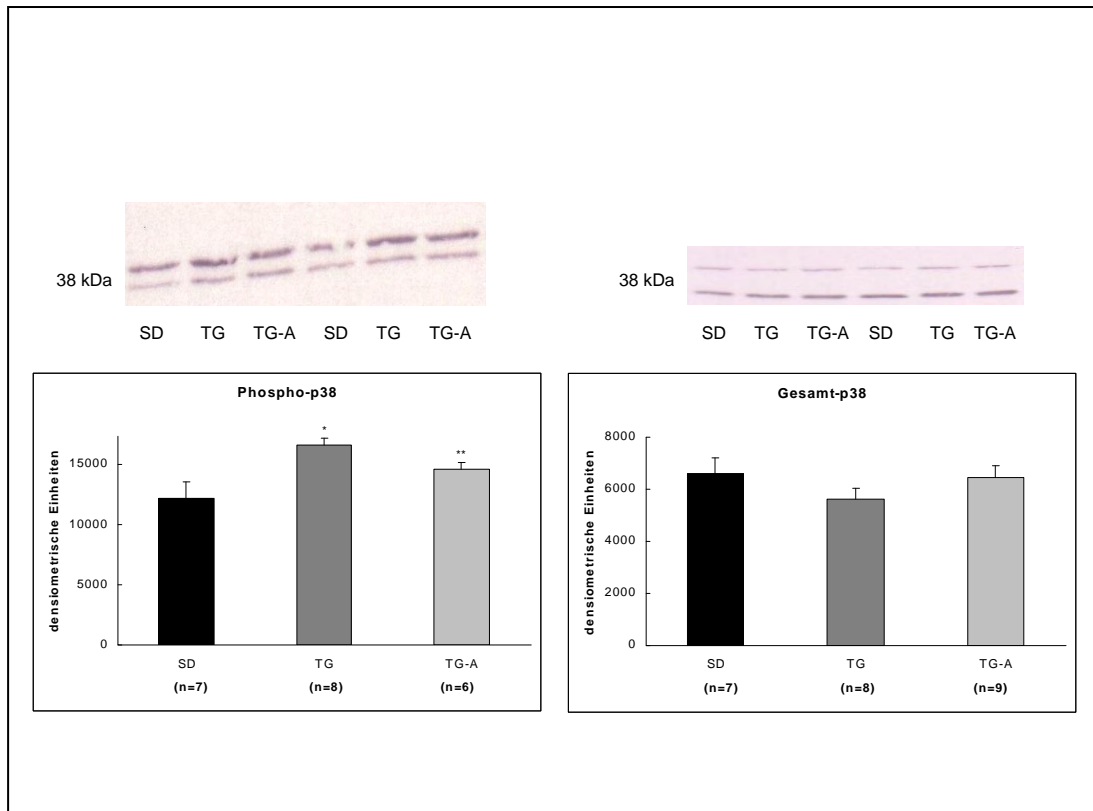


**Abbildung 14:** Phosphorylierter Anteil des MAP-Kinasen-p44/42-Proteins korrigiert auf den Gehalt an Gesamt-p44/42-Protein. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \*= $p=0,001$  vs. SD, \*\*= $p<0,05$  vs. TG

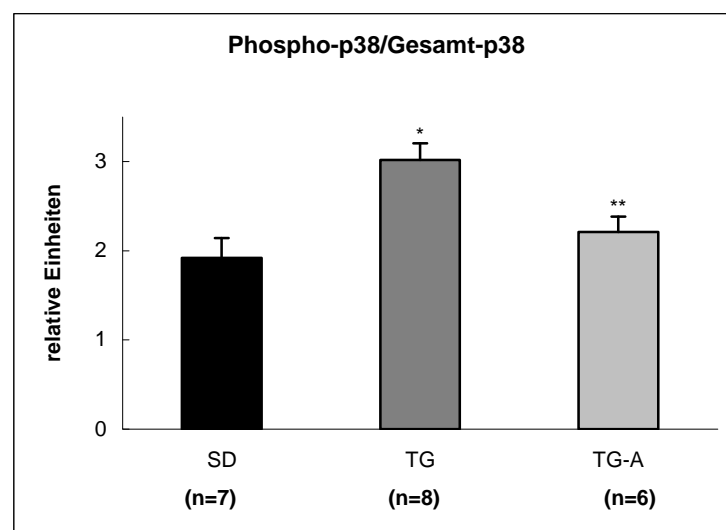
### 3.4.2. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38

Auch bei der MAP-Kinase p38 zeigte sich eine statistisch signifikant vermehrte Phosphorylierung durch die Überexprimierung des Transgens (Abbildung 15). Diese wurde durch die Behandlung mit Atorvastatin reduziert. Bei dieser MAP-Kinase wurde der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen durch die rechnerische Nivellierung der geringfügig unterschiedlichen Beladung der einzelnen Slots ebenfalls deutlicher (Abbildung 16).





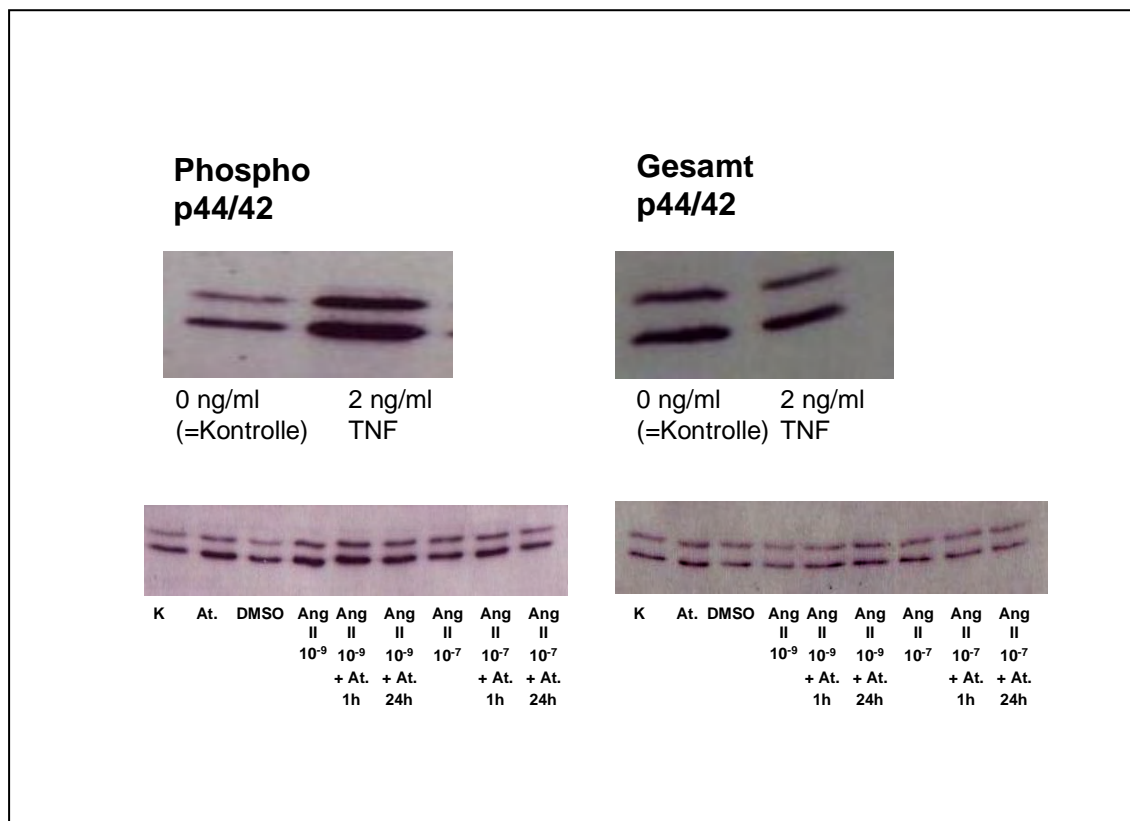
**Abbildung 15:** Einfluss einer sechswöchigen Atorvastatintherapie Renin-transgener Ratten auf den Aktivierungszustand der MAP-Kinase p38. Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative Original-Western-Blots, die Säulendiagramme im unteren Teil die statistischen Mittelwerte für die einzelnen Gruppen nach densitometrischer Auswertung der immunochemischen Signale. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach Atorvastatin-Behandlung. \* =  $p < 0,01$  vs. SD, \*\* =  $p < 0,05$  vs. TG



**Abbildung 16:** Der Phospho-p38-Anteil korrigiert auf den Gehalt an Gesamt-p38. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten, TG=Renin-transgene Ratten, TG-A=Renin-transgene Ratten nach sechswöchiger Therapie mit Atorvastatin. \* =  $p < 0,01$  vs. SD, \*\* =  $p = 0,01$  vs. TG

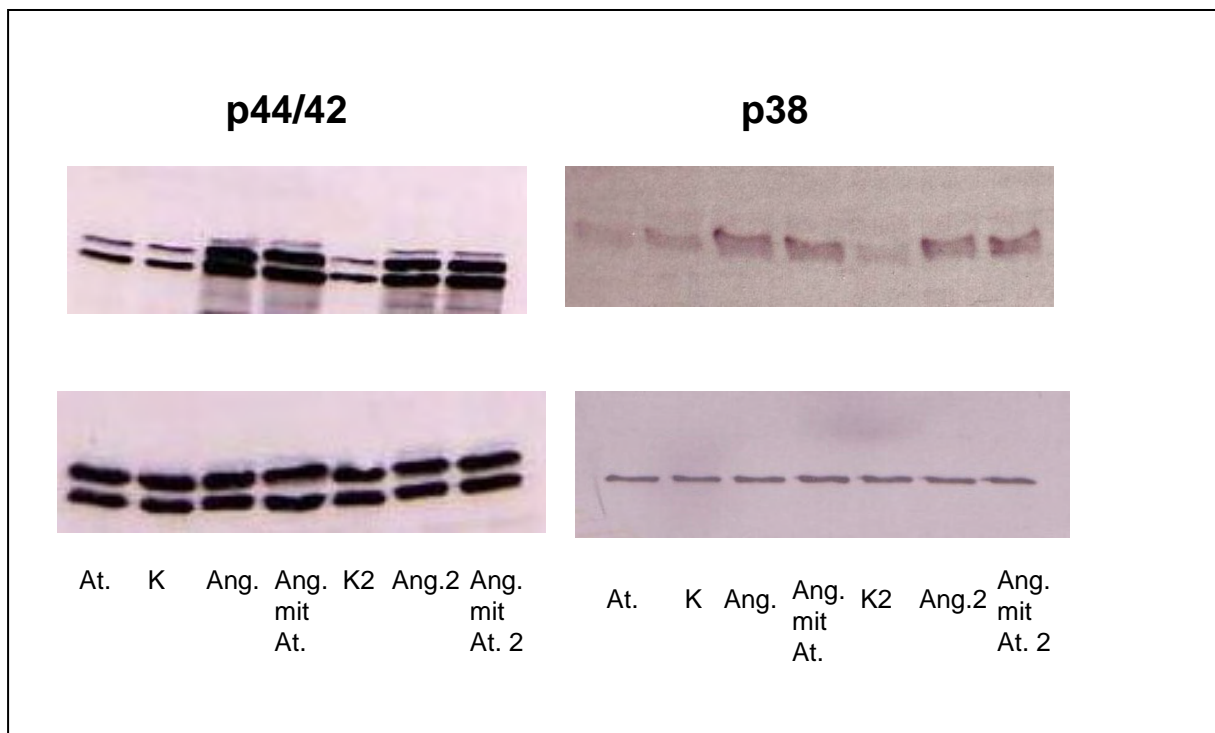
### 3.5. In-Vitro-Untersuchung des Einflusses von Atorvastatin auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38

Um zu untersuchen, ob der *in vivo* beobachtete Effekt von Atorvastatin auf MAP-Kinase-Signalkaskaden auch *in vitro* nachgewiesen werden kann, wurden Versuche mit neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte in Zellkultur durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Inkubation mit Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) bzw. Angiotensin II (Ang II) stimuliert. Mit aus den Zellen gewonnenen Proteinlösungen wurden Western-Blots angefertigt, bei denen ebenfalls Primär-Antikörper gegen Phospho-p38, -p44/42 sowie Gesamt-p38 und -p44/42 verwendet wurden. Die Gesamtmenge der beiden MAP-Kinasen blieb durch den Einfluss von TNF $\alpha$  und Ang II auch hier gleich, es stieg nur der phosphorylierte Anteil (Abbildungen 17, 18, 19, 20 und 21).



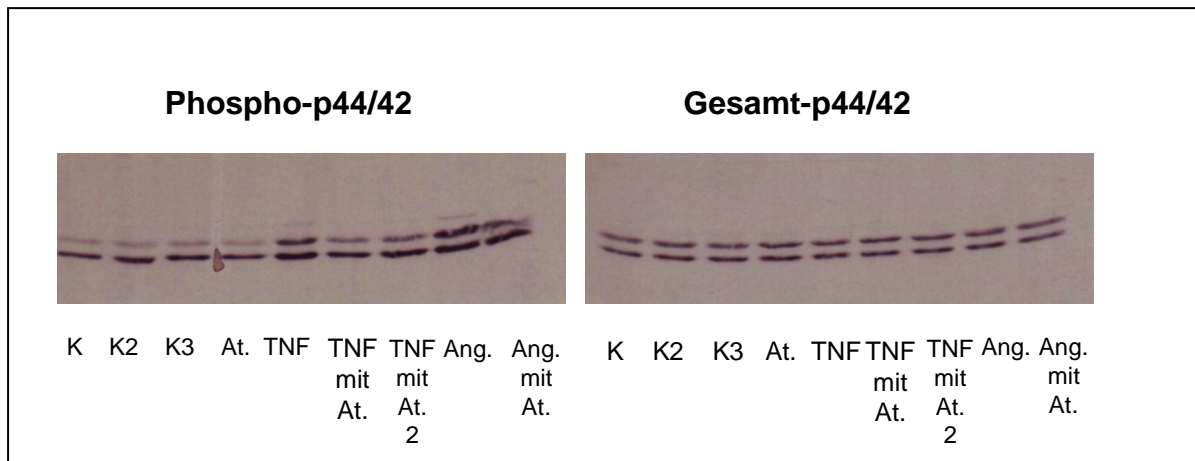
**Abbildung 17:** Repräsentative Original-Western-Blots von Proben, die aus zuvor mit Ang II resp. TNF $\alpha$  stimulierten neonatalen Kardiomyozyten gewonnen wurden. Der linke Teil der Abbildung zeigt das Chemilumineszenzsignal der phosphorylierten MAP-Kinase p44/42, der rechte Teil das Signal des entsprechenden Gesamtproteins. At=Atorvastatin

Die Hälfte der Zellkulturpopulationen, denen Ang II oder TNF $\alpha$  ins Medium gegeben wurde, wurde mit Atorvastatin vorinkubiert. Wie in den Abbildungen (Abbildung 17, 18, 20 und 21) ersichtlich, führte das Einwirken des Atorvastatins bzw. des Dimethylsulfoxids (DMSO), in dem das Atorvastatin gelöst worden war, auf ansonsten unbehandelte Zellen zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Phosphorylierung im Vergleich zu gänzlich unbeeinflussten Zellen. Ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss hatte das Atorvastatin auf die vermehrte Phosphorylierung von p44/42 und p38, wenn sie durch Ang II ausgelöst wurde. Lediglich bei der MAP-Kinase p44/42 kam es zu einer geringfügigen Herabregulation der Menge an der phosphorylierten Form (Abbildung 20).

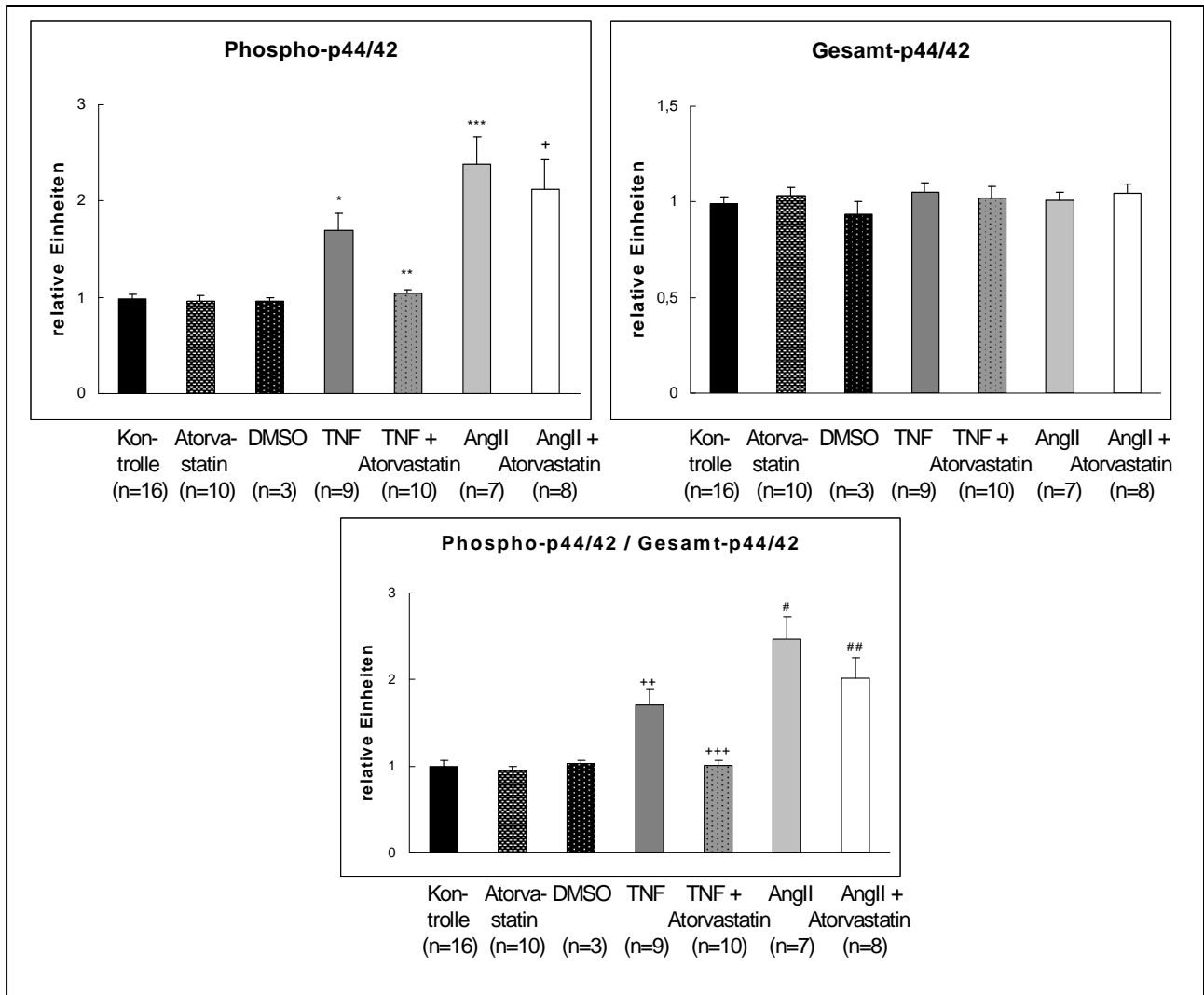


**Abbildung 18:** Repräsentative Original-Western-Blots von mit Atorvastatin und/oder Ang II inkubierten Zellkultur-Proben. Der linke Teil der Abbildung zeigt oben das Chemilumineszenzsignal der phosphorylierten MAP-Kinase p44/42, der rechte Teil das der p38. Unten ist jeweils das Signal des entsprechenden Gesamtproteins zu sehen. At.=mit Atorvastatin inkubierte Zellen, K=Kontrolle, Ang.=mit Ang II inkubierte Zellen, Ang. mit At.=mit Ang II und Atorvastatin inkubierte Zellen, K2=Kontrolle Probe Nr. 2, Ang.2=mit Ang II inkubierte Zellen Probe Nr. 2, Ang. mit At. 2=mit Ang II und Atorvastatin inkubierte Zellen Probe Nr. 2

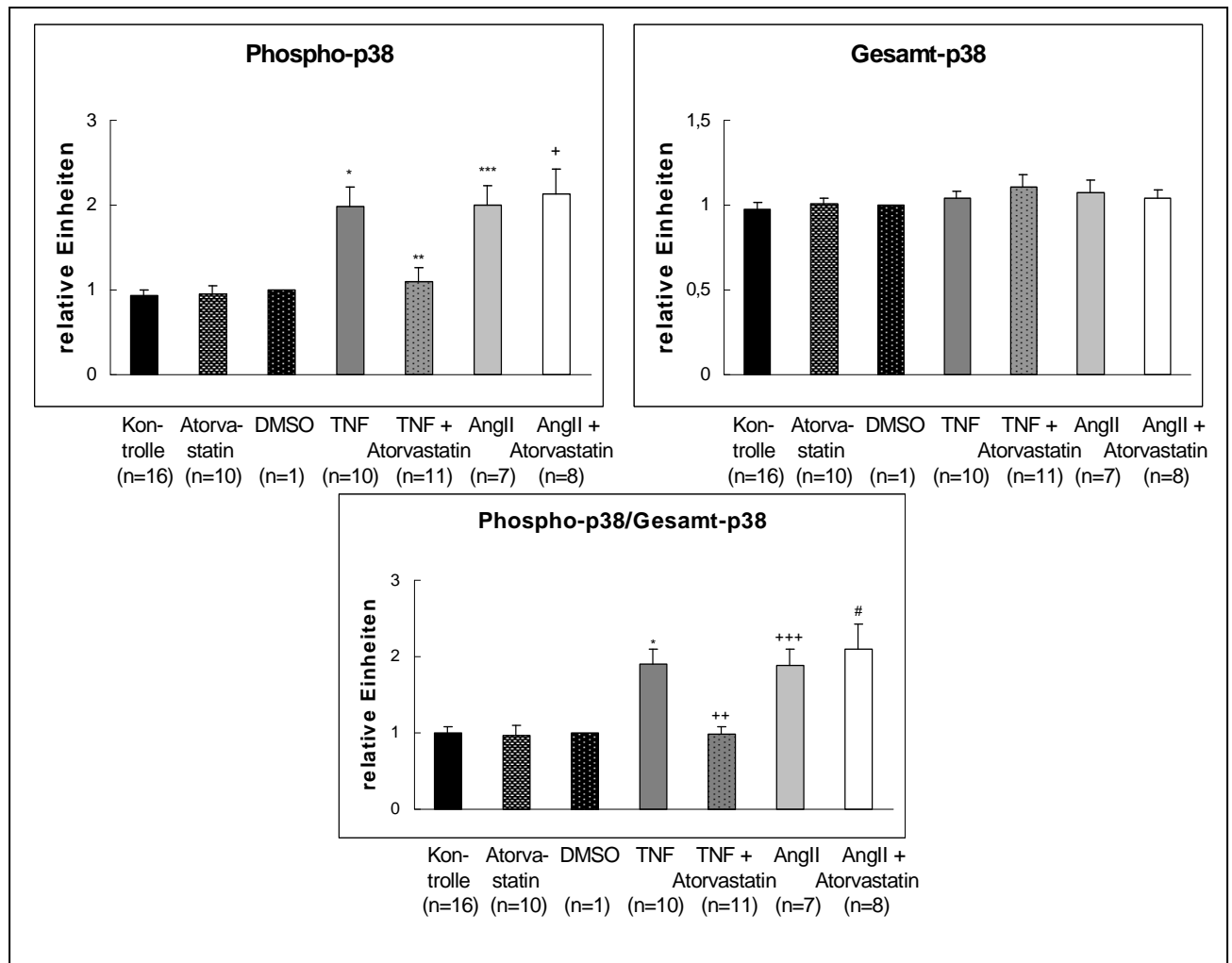
Wurden die Zellen mit TNF $\alpha$  inkubiert, beeinflusste das Atorvastatin die Aktivierung der beiden MAP-Kinasen dahingehend, dass es zu einer Normalisierung dieses Parameters kam, d.h. das Chemilumineszenzsignal der mit Atorvastatin und TNF $\alpha$  „behandelten“ Zellproben unterschied sich kaum oder nicht in seiner Intensität von dem der Kontroll- bzw. nur mit DMSO oder Atorvastatin behandelten Zellen (Abbildung 19, 20 und 21).



**Abbildung 19:** Repräsentativer Original-Western-Blot von mit Atorvastatin, TNF $\alpha$  und/oder Ang II inkubierten Zellkulturproben. Der linke Teil der Abbildung zeigt das immunochemische Signal der phosphorylierten MAP-Kinase p44/42, der rechte Teil das Signal des entsprechenden Gesamtproteins. K=Kontrolle, K2=Kontrolle Probe Nr. 2, K3=Kontrolle Probe Nr. 3, At.=mit Atorvastatin inkubierte Zellen, TNF=mit TNF $\alpha$  inkubierte Zellen, TNF + At.=mit TNF $\alpha$  und Atorvastatin inkubierte Zellen, TNF + At. 2=mit TNF $\alpha$  und Atorvastatin inkubierte Zellen Probe Nr. 2, Ang.=mit Ang II inkubierte Zellen, Ang. mit At.=mit Ang II und Atorvastatin inkubierte Zellen



**Abbildung 20:** Ergebnis der Western-Blot-Untersuchungen zur Quantifizierung von Phospho-p44/42 resp. Gesamt-p44/42. Die Säulendiagramme geben die statistischen Mittelwerte für die Chemilumineszenzsignale nach Quantifizierung durch die Image J-Software wieder. Der untere Teil der Abbildung zeigt den Phospho-p44/42-Anteil korrigiert auf den Gehalt an Gesamt-p44/42. \*= $p < 0,05$  vs. DMSO,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle und  $p = 0,001$  vs. Atorvastatin; \*\*= $p < 0,001$  vs. Ang II und  $p = 0,002$  vs. TNF; \*\*\*= $p < 0,05$  vs. DMSO,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle und Atorvastatin sowie  $p = 0,002$  vs. TNF mit Atorvastatin; += $p < 0,05$  vs. DMSO,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle und  $p = 0,001$  vs. Atorvastatin; ++= $p < 0,001$  vs. Kontrolle und Atorvastatin; +++= $p = 0,001$  vs. TNF; #= $p < 0,001$  vs. Kontrolle, Atorvastatin und TNF + Atorvastatin sowie  $p < 0,01$  vs. DMSO; ##= $p < 0,05$  vs. DMSO und  $p < 0,001$  vs. Kontrolle, Atorvastatin und TNF + Atorvastatin



**Abbildung 21:** Ergebnis der Western-Blot-Untersuchungen zur Quantifizierung von Phospho-p38 bzw. Gesamt-p38. Es werden die statistischen Mittelwerte für die Chemilumineszenzsignale nach Quantifizierung durch die Image J-Software gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist der Phospho-p38-Gehalt korrigiert auf den Gehalt an Gesamt-p38 zu sehen. \*= $p \leq 0,001$  vs. Kontrolle und  $p = 0,001$  vs. Atorvastatin; \*\*= $p = 0,005$  vs. TNF; \*\*\*= $p < 0,001$  vs. Kontrolle und Atorvastatin sowie  $p = 0,005$  vs. TNF mit Atorvastatin; += $p < 0,001$  vs. Kontrolle,  $p = 0,001$  vs. Atorvastatin und  $p < 0,01$  vs. TNF mit Atorvastatin; ++= $p < 0,001$  vs. TNF; +++= $p < 0,001$  vs. Kontrolle sowie  $p = 0,001$  vs. Atorvastatin und TNF mit Atorvastatin; #= $p < 0,001$  vs. Kontrolle sowie  $p < 0,01$  vs. Atorvastatin und TNF mit Atorvastatin

## 4. Diskussion

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren zunehmende Hinweise, wonach HMGCoA-Reduktasehemmer positive Auswirkungen auf das koronare Risiko haben, die sich nicht allein mit deren cholesterinsenkender Wirkung erklären lassen (Maron et al., 2000; Ridker et al. 1999; Grundy, 1998; Ong, 2002; Vaughan et al., 1996). So führten sie zu einer Heraufregulation der endothelialen NO-Synthase in menschlichen Endothelzellen *in vitro* – und hierüber möglicherweise zu einer Verbesserung der Endothelfunktion – bzw. *in vivo* in Mäusen nach Ischämie-Reperusionsversuchen (Laufs et al., 1997; Laufs et al., 1998; Jones et al., 2002). Außerdem hemmten sie die Sekretion von Typ IV-Kollagen *in vitro* (Nishimura et al., 1999). Eine durch Noradrenalin induzierte Hypertrophie von neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte konnte durch Simvastatin vermindert werden (Luo et al., 2001).

Zur Untersuchung, ob durch eine Behandlung mit dem lipophilen HMGCoA-Reduktasehemmer Atorvastatin die Ausbildung einer durch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System (RAS) verursachten hypertrophen Kardiomyopathie entgegengewirkt und eine Verbesserung der kontraktile Funktion erreicht werden kann, wurde ein transgenes Rattenmodell mit einer Überexpression des Mäuserenings (TG(mRen2)27) verwendet. Desweiteren wurden In-Vitro-Versuche an neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte durchgeführt.

### 4.1. Effekte von HMGCoA-Reduktasehemmern auf den kardialen Phänotyp

#### 4.1.1. Körpergewicht, linksventrikuläres Gewicht bzw. linksventrikuläre Masse

Die transgenen Ratten wurden von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche mit Atorvastatin behandelt. In diesem Zeitraum blieben die unbehandelten transgenen Tiere deutlich im Wachstum und somit in der Gewichtszunahme hinter den altersgleichen Kontrolltieren zurück. Die Therapie mit Atorvastatin wirkte sich positiv auf die Gewichtszunahme der transgenen Tiere aus, und insgesamt erschienen die mit Atorvastatin behandelten transgenen Ratten auch vitaler als die unbehandelten transgenen Tiere. Die ebenfalls behandelten Kontrolltiere zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Sprague-Dawley-Kontrollratten keine zusätzliche

Gewichtszunahme. Allgemein das Körperwachstum stimulierende Effekte des Atorvastatins können also ausgeschlossen werden. Desweiteren zeigten die transgenen Ratten eine deutliche Zunahme des relativen linksventrikulären Gewichtes, wie es bereits vor Jahren an diesem Tiermodell gezeigt wurde (Zolk et al., 1998). Dies wurde durch die Atorvastatin-Gabe abgeschwächt.

Das Ergebnis bezüglich des Körpergewichts steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Lee et al. (2005) und Zhai et al. (2008), die spontan hypertensive Ratten von der achten bis zur sechzehnten beziehungsweise von der vierzehnten bis zur zweiundzwanzigsten Lebenswoche mit den hydrophilen HMGCoA-Reduktasehemmern Pravastatin beziehungsweise Fluvastatin behandelten. Auch hier hatten die hypertensiven Ratten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die Kontrolltiere, was aber durch das Statin unbeeinflusst blieb. Ohne die Daten von Lee et al. (2005) zu berücksichtigen, könnte bei den Versuchen von Zhai et al. (2008) der verhältnismäßig späte Therapiebeginn ein Zurückbleiben der Tiere im Wachstum trotz sonst dosisabhängig verbesserter relevanter Parameter erklären. Eine 2007 publizierte Arbeit (Habibi et al., 2007), bei der – wie auch bei der vorliegenden Arbeit – Renin-transgene Ratten (TG(mRen2)27) verwendet wurden, bestätigt die Beobachtung, dass eine Statintherapie das reduzierte Gewicht der unbehandelten Tiere nicht positiv beeinflussen kann. Allerdings wurden die Ratten über einen deutlich kürzeren Zeitraum von nur drei Wochen behandelt. Der Zeitpunkt des Therapiebeginns entsprach dem der vorliegenden Arbeit (sechste bis siebte Lebenswoche). Für diese Arbeit kam Rosuvastatin zum Einsatz.

Eine japanische Arbeitsgruppe, die salzempfindliche Dahl-Ratten als Tiermodell verwendete, behandelte diese mit einer salzreichen Diät gefütterten Tiere ab der sechsten Lebenswoche elf Wochen lang mit Cerivastatin. Sowohl mit Cerivastatin behandelte als auch unbehandelte Ratten entwickelten eine Hypertonie. Die unbehandelten Tiere zeigten hier ebenfalls ein reduziertes Körpergewicht gegenüber der Kontrollgruppe. In diesem Fall kam es zu einem statistisch signifikant höheren Körpergewicht im Vergleich zu den unbehandelten Tieren durch die Statingabe, welches sich – wie auch bei den in dieser Arbeit vorliegenden Daten – nicht komplett an das Körpergewicht der Kontrolltiere anglich. (Hasegawa et al., 2003) Entsprechende Beobachtungen mit demselben Tiermodell und einer Behandlung mit



Pitavastatin von der siebten bis zur zwölften Lebenswoche hat eine weitere japanische Arbeitsgruppe drei Jahre später veröffentlicht (Saka et al., 2006 b).

Versuche an Kaninchen, bei denen eine chronische Herzinsuffizienz durch Tachykardie (100 Schläge über der Herzfrequenz in Ruhe; bis zu 340 Schläge pro Minute) verursacht wurde, zeigten ein im Trend erniedrigtes Körpergewicht im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Tachykardie wurde mittels einer am Epikard angebrachten Elektrode ausgelöst. Bei mit Simvastatin behandelten Kaninchen mit Tachykardie normalisierte sich das Körpergewicht nahezu vollständig (Gao et al., 2005).

Interessanterweise handelt es sich bei Prava-, Fluva- und Rosuvastatin um hydrophile, bei Atorva-, Pitava-, Simva- und Cerivastatin um lipophile HMGCoA-Reduktasehemmer, was als Erklärungsversuch für diese unterschiedlichen Resultate in Bezug auf das Körpergewicht der Tiere aber dadurch nicht logisch erscheint, dass der relevantere Parameter – das relative linksventrikuläre Gewicht (LV-Gewicht) – von den hydrophilen und den lipophilen Statinen in gleicher Weise beeinflusst wurde. Es kam – wie auch in der vorliegenden Arbeit – zu einer teilweisen Normalisierung des durch den Bluthochdruck angestiegenen relativen LV-Gewichtes durch die Gabe eines HMGCoA-Reduktasehemmers (Hasegawa et al., 2003; Saka et al., 2006 b; Lee et al., 2005; Zhai et al., 2008) bzw. zu einer vollständigen Normalisierung bei Javad Habibi et. al. (2007). In dieser Veröffentlichung wird als Hinweis auf eine verbesserte hämodynamische Situation durch die Rosuvastatintherapie eine signifikant verbesserte Ejektionsfraktion gezeigt, wodurch eine eventuell schlechtere Wirksamkeit der hydrophilen gegenüber den lipophilen Statinen oder eine unzureichend hohe Dosierung damit als potentielle Erklärung für eine unterschiedliche Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Tiere in den einzelnen Arbeiten quasi ausgeschlossen werden kann. Eine deutsche Arbeitsgruppe hat bemerkenswerterweise keinerlei Unterschiede im Körpergewicht zwischen Sprague-Dawley-Kontrollratten, für humanes Renin und Angiotensinogen transgene Ratten und solche, die drei Wochen mit Cerivastatin behandelt wurden, festgestellt (Dechend et al., 2001 b). Das relative Herzgewicht der transgenen Tiere war allerdings im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht, was durch Cerivastatintherapie abgeschwächt wurde. Diesen Resultaten – keine Unterschiede

zwischen den Gruppen bezüglich des Körpergewichts, aber eine Herabregulation eines erhöhten linksventrikulären Gewichts durch die Gabe eines HMGCoA-Reduktasehemmers – entsprechen auch die Beobachtungen einer japanischen Arbeitsgruppe an Mäusen, die mit Angiotensin II und/oder Pravastatin behandelt wurden (Xu et al., 2008), sowie einer Arbeitsgruppe aus den USA und Kanada, die ein Q403 $\beta$ -Myosin-transgenes Kaninchen-Modell der hypertrophen Kardiomyopathie und Atorvastatin verwendet hatten (Senthil et al., 2005). Eine im Jahre 2006 erschienene Arbeit zeigt eine teilweise Normalisierung eines erniedrigten Körpergewichts sowie eines erhöhten linksventrikulären Gewichts durch den hydrophilen Wirkstoff Rosuvastatin bei salzempfindlichen DOCA-Ratten, denen eine Niere entfernt wurde (Loch et al., 2006).

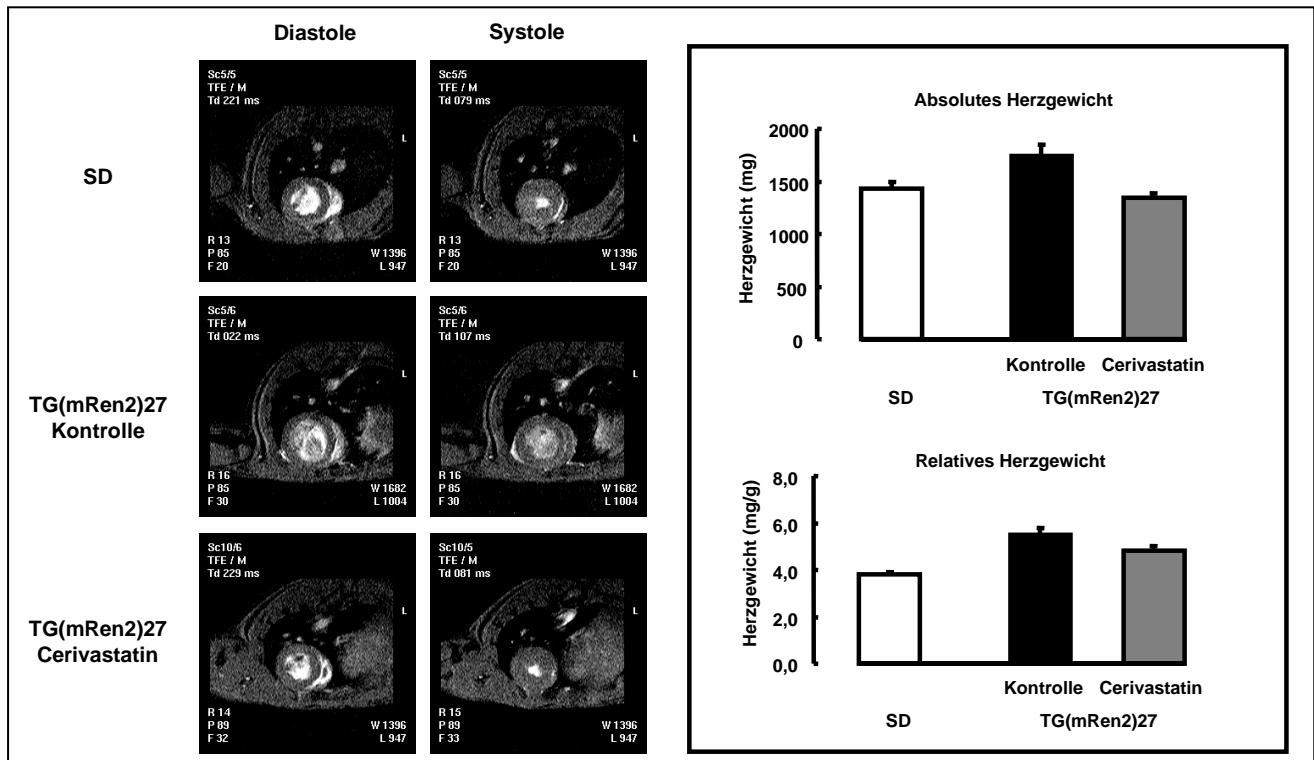
Im Hinblick auf das zuvor bereits erwähnte relative LV-Gewicht zeigen verschiedene Veröffentlichungen, bei denen Bluthochdruck durch operative Maßnahmen erzeugt wurde, analoge Ergebnisse zu den oben beschriebenen. Lee et al. haben in einem 2006 (a) erscheinenden Artikel gezeigt, dass Wistar-Ratten, bei denen eine Nierenarterie verschlossen wurde, durch eine achtwöchige Therapie mit Pravastatin signifikant niedrigere relative LV-Gewichte aufwiesen als mit Placebo oder anderen Substanzen behandelte Tiere. In fünf weiteren Publikation (Richardson et al., 2005; Liao et al., 2008; Planavila et al., 2005; Planavila et al., 2007; Liu et al., 2008) wurden Mäuse bzw. Ratten einer Operation unterzogen, bei der die Aorta verengt wurde, was in allen Fällen zu einer Vergrößerung des linken Ventrikels führte. Alle vier Arbeitsgruppen beobachteten eine Normalisierung des Parameters relatives LV-Gewicht durch Therapie mit Simvastatin bzw. Atorvastatin. Eine weitere Arbeitsgruppe hat ebenfalls mit einem entsprechenden Rattenmodell gearbeitet. Hier wurden die Tiere entweder einen oder drei Tage postoperativ getötet und sowohl das absolute als auch das relative Feucht- bzw. Trockengewicht des linken Ventrikels (bezogen auf das Körpergewicht bzw. das rechtsventrikuläre Gewicht) bestimmt. Ein Teil der Ratten hatte ab dem Tag vor der Operation Rosuvastatin in einer Dosierung von 2 mg pro kg Körpergewicht, ein weiterer in einer Dosierung von 10 mg pro kg Körpergewicht erhalten. Interessanterweise wurde durch die niedrige Rosuvastatin-Dosis das relative linksventrikuläre Feuchtgewicht im Trend günstig, durch die hohe Dosierung im Trend ungünstig in Form eines weiteren Anstiegs beeinflusst (Cirrincione et al., 2006). Allerdings erscheint die Behandlungsdauer von

nur wenigen Tagen als sehr kurz und es hätte nach einer längeren Zeit eventuell zu anderen Resultaten kommen können.

Bei spontan hypertensiven Ratten wurde das relative LV-Gewicht durch Atorvastatintherapie signifikant gesenkt (Kang et al., 2007 a). Auch bei salzempfindlichen Dahl-Ratten, die eine salzreiche Diät (4% bzw. 8% NaCl) erhielten, konnte einer linksventrikulären Hypertrophie durch die Therapie mit Atorvastatin bzw. Pitavastatin entgegengewirkt werden (Zhou et al., 2004; Saka et al., 2006 a). Eine Umstellung der Fütterung auf eine 0,4% Kochsalz enthaltende Nahrung nach einer sechswöchigen Fütterung der salzreichen Diät beeinflusste das relative LV-Gewicht nicht. Wurde aber zusätzlich zu dieser Maßnahme Atorvastatin verabreicht, kam es fast zu einer Normalisierung dieses Parameters (Zhou et al., 2004). Eine japanische Arbeitsgruppe, die männlichen Wistar-Ratten über eine osmotische Minipumpe Angiotensin II verabreicht und dadurch eine linksventrikuläre Hypertrophie erzeugt hat, erreichte ebenfalls eine Normalisierung des relativen LV-Gewichts durch die Therapie mit einem HMGCoA-Reduktasehemmer – in diesem Fall Fluvastatin (Morikawa-Futamatsu et al., 2006). Eine im September 2008 erschienene Publikation beschreibt eine dem entsprechende Wirkung durch Simvastatin, das zwei Monate alten Bradykinin-2-Rezeptor-Knockout-Mäusen sechs Wochen lang verabreicht wurde. Einem Viertel der Knockout-Tiere wurde ein Inhibitor der NO-Synthase verabreicht. Ihre echokardiographisch ermittelte LV-Masse nahm noch stärker zu als bei den Tieren, die Placebo erhalten hatten. Bekamen die Mäuse ohne NO-Synthase-Hemmung Simvastatin, normalisierte sich ihre LV-Masse vollständig. Die linksventrikuläre Masse der Tiere, die den NO-Synthase-Inhibitor und zusätzlich Simvastatin erhalten hatten, war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen noch erhöht, lag aber sehr deutlich unter der der Knockout-Mäuse mit Hemmung der NO-Synthase. Auch die Wildtyp-Mäuse wurden in die vier oben genannten Gruppen aufgeteilt. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied durch die Verabreichung der Substanzen (Osorio et al., 2008)

Von der eigenen Arbeitsgruppe liegen unveröffentlichte Daten vor, die vor einigen Jahren am selben Tiermodell wie in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden. Für diese Versuche wurde ein Teil der Renin-transgenen Ratten mit Cerivastatin behandelt. Auch diese Tiere wurden mit Hilfe der Magnetresonanztomographie und

mittels Herzkatheter untersucht. Das bei diesen Tieren ermittelte absolute Herzgewicht war bei den transgenen Ratten erhöht und wurde durch den Cerivastatin-Einfluss normalisiert. Das relative Herzgewicht war bei den transgenen Tieren ebenfalls erhöht. Hier ergab sich in der Gruppe der behandelten Ratten ein Wert, der zwischen dem der Kontroll- und der transgenen Ratten lag.



**Abbildung 22:** Vermindertes absolutes und relatives Herzgewicht von Renin-transgenen Ratten nach einer mehrwöchigen Therapie mit Cerivastatin. Der linke Teil der Abbildung zeigt repräsentative magnetresonanztomographische Originalaufnahmen, der rechte Teil gibt die statistischen Mittelwerte der Herzgewichte wieder. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten. Abbildungen erstellt von Dr. Markus Fleisch

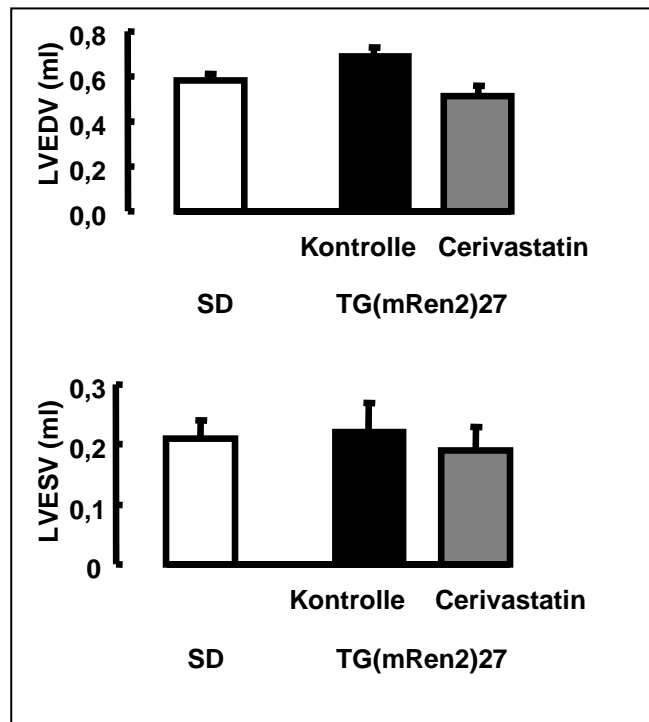
Die Ergebnisse der magnetresonanztomographischen Ermittlung der linksventrikulären Masse und die mittels Wiegen festgestellten linksventrikulären Gewichte korrelierten in der vorliegenden Arbeit in hohem Maße miteinander. Die durch Wiegen ermittelten Werte lagen in der Regel etwas über den berechneten, was daran gelegen haben könnte, dass es durch eine Vergrößerung der Abbildungen der Herzen einfacher war, die Grenze zwischen Ventrikel und Atrium präzise zu erkennen. So könnte ein wenig anhaftendes Klappen- oder Vorhofgewebe das Gewicht fälschlich erhöht haben.

#### **4.1.2. Enddiastolische linksventrikuläre Wanddicke sowie linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und linksventrikuläres enddiastolisches Volumen**

Passend zur Zunahme der Masse bzw. des Gewichts des linken Ventrikels nahm die linksventrikuläre Wanddicke bei den Renin-transgenen Ratten zu, was auf den MRT-Abbildungen schon mit bloßem Auge unschwer zu erkennen war (Abbildung 4). Der enddiastolische Durchmesser (LVEDD) der linken Herzkammer verengte sich. Analog dazu reduzierte sich zwangsläufig das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV) als dreidimensionaler Ausdruck des Durchmessers. Diese Beobachtungen zeigen, dass bei diesen Tieren eine Hypertrophie des linken Ventrikels ohne Hinweise auf eine Dilatation vorlag. Durch die Therapie mit Atorvastatin veränderten sich diese Parameter in Richtung einer Angleichung an die Werte der Kontrolltiere.

Bei einem dieser Parameter – dem LVEDD – kam es zu keiner statistisch signifikanten Angleichung der Ergebnisse der behandelten Tiergruppe an die der unbehandelten Gruppe transgener Ratten, sondern nur zu einer Angleichung im Trend (Abbildung 6). Allerdings fand die unterschiedliche Körpergröße der Tiere in den einzelnen Gruppen bei diesen Parametern keine Berücksichtigung, was sich ja zumindest in Bezug auf die Herzmasse relevant ausgewirkt hat. Ob sich die o.g. Parameter davon hätten beeinflussen lassen, bleibt spekulativ, ist aber wahrscheinlich.

Der reduzierte LVEDD bzw. das verminderte LVEDV stehen im Widerspruch zu den unveröffentlichten, im eigenen Hause ebenfalls mittels Kernspintomographie ermittelten Daten, bei denen in der Gruppe der unbehandelten Renin-transgenen Ratten das linksventrikuläre endsystolische Volumen (LVESV) leicht und das LVEDV etwas deutlicher zugenommen hatten. Dieses Resultat spricht für eine gleichzeitig mit der Hypertrophie vorliegende Dilatation des linken Ventrikels. Sowohl das LVESV als auch das LVEDV war in der Gruppe der mit Cerivastatin behandelten transgenen Ratten deutlich geringer als in der Gruppe der unbehandelten.



**Abbildung 23:** Einfluss einer Therapie mit Cerivastatin auf das linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumen von Renin-transgenen Ratten. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten. Abbildungen erstellt von Dr. Markus Flesch

Die Arbeitsgruppe von Lee et al. (2006 a) führte zur Ermittlung der Hinterwanddicke des linken Ventrikels echokardiographische Untersuchungen durch und kam ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Abnahme dieses Parameters durch die Behandlung mit dem HMGCoA-Reduktasehemmer. Die oben bereits erwähnten japanischen Veröffentlichungen (Liao et al., 2008; Hasegawa et al., 2003; Saka et al., 2006 b; Morikawa-Futamatsu et al., 2006) sowie die von Senthil et al. (2005) kommen zu dem entsprechenden Ergebnissen, die ebenfalls mit Hilfe der Echokardiographie erhoben wurden. Bei Xu et al. (2008) handelt es sich lediglich um ein Trendergebnis, das aber in dieselbe Richtung geht. Auch eine chinesische Arbeitsgruppe kommt zu analogen Ergebnissen bzgl. der Wanddicke ohne anzugeben, wie die Daten ermittelt wurden (Ping et al., 2006). Lediglich die 2006 (a) im Journal of Cardiovascular Pharmacology erschienene Publikation von Saka et al. zeigte keine Beeinflussung der Hinterwanddicke durch die Verabreichung von Pitavastatin.

Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser war bei Lee et al. (2006a), Gao et al. (2005), Saka et al. (2006 a), Senthil et al. (2005) sowie bei Hasegawa et al. (2003) bei den Tieren mit vergrößertem (relativem) Herzgewicht heraufgesetzt und wurde durch die Statintherapie wieder vermindert. Dies lässt vermuten, dass in diesen Fällen bereits eine Dilatation des linken Ventrikels vorlag. Saka et al. (2006 b) zeigen in einer anderen Arbeit ein Trendergebnis, bei dem es zu einer Verkleinerung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers bei den hypertrophierten Herzen und einer geringgradigen Aufhebung durch die Therapie mit Pitavastatin kam.

Richardson et al. (2005) haben – ebenfalls mit Hilfe der Echokardiographie – das enddiastolische linksventrikuläre Volumen von Mäusen berechnet, bei denen eine durch Verengung der Aorta – also durch linksventrikuläre Druckbelastung – induzierte linksventrikuläre Hypertrophie vorlag. Die Werte, die für diesen Parameter angegeben sind, erscheinen bis auf den der Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere schlüssig, wenn man von der großen Inhomogenität der Gruppe der mit Simvastatin behandelten Kontrolltiere absieht. Demnach kam es bei den operierten unbehandelten Tieren zu einem deutlich verringerten LVEDV gegenüber den scheinoperierten und mit Simvastatin behandelten Tieren, während das LVEDV der behandelten operierten Mäuse zwischen beiden Werten (näher am Wert der behandelten Kontrolltiere) lag. Unstimmig ist hier, dass die scheinoperierten unbehandelten Tiere ein fast so schlechtes LVEDV aufwiesen wie die operierten unbehandelten.

Das 2007 publizierte Ergebnis einer randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Studie an Patienten mit einer hypertrophen Kardiomyopathie, die über neun Monate täglich 80 mg Atorvastatin erhielten, zeigte keinerlei Beeinflussung diverser Parameter wie unter anderem LVEDV, LVEDD und LV-Masse (Bauersachs et al. 2007). Mögliche Erklärungen für einen fehlenden Therapieerfolg sind in einer anderen Publikation genannt worden, deren Gegenstand ebenfalls eine Studie an Patienten war (Krum et al., 2007). Hierzu sei auf den Abschnitt „Schlagvolumen“ verwiesen.

#### **4.1.3. Myokardfibrose**

Durch die Auswirkungen des Transgens kam es zu einem vermehrten Kollagengehalt im linken Ventrikel, was durch die Atorvastatingabe aufgehoben wurde. Bei den in dieser Arbeit vorliegenden Daten war bei den histologischen Gewebeschnitten der mit Atorvastatin behandelten Tiere ein geringfügig niedrigerer Kollagenanteil gemessen worden als bei den Kontrollratten. Dieses Phänomen wird aber von verschiedenen Arbeitsgruppen nicht bestätigt. Beispielfhaft seien hier die bereits oben genannten Hasegawa et al. (2003) und Liao et al. (2008) erwähnt, bei denen jeweils der Kollagengehalt der mit einem HMGCoA-Reduktasehemmer behandelten Tiere zwischen dem der Kontrolltiere und der unbehandelten Tiere mit hypertrophierten Herzen lag. Eine mögliche Erklärung dafür ergab sich bei mikroskopischer Betrachtung der Gewebeschnitte, bei der deren Qualität zwischen den einzelnen Gruppen variierte. So erschienen die Präparate der hypertrophen Herzen – sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Ratten – gleichmäßiger, die von den Kontrolltieren angefertigten Präparate wiesen hin und wieder an verschiedenen Stellen eine unterschiedliche Schichtdicke auf. Da die Herzwände der Kontrolltiere dünner waren als die der transgenen Ratten, könnten sie schwieriger zu schneiden gewesen sein.

Eine antifibrotische Wirkung der HMGCoA-Reduktasehemmer wird auch von den ebenfalls bereits erwähnten Arbeitsgruppen von Habibi et al. (2007), Lee et al. (2006 a), Zhai et al. (2008) und Senthil et al. (2005) bestätigt. Die Veröffentlichungen einer japanischen Arbeitsgruppe (Saka et al., 2006 a und b) beschreiben eine verminderte linksventrikuläre Fibrose bei salzempfindlichen Dahl-Ratten, die zusätzlich zu ihrer salzreichen Diät Pitavastatin erhielten. Eine weitere japanische Arbeit zeigt eine Herabregulation von Kollagen I mRNA sowie eine verminderte interstitielle und perivaskuläre Fibrose bei Mäusen mit durch Angiotensin II induziertem Bluthochdruck nach Pravastatintherapie (Xu et al., 2008). Auch bei spontan hypertensiven Ratten konnte mit einem HMGCoA-Reduktasehemmer – in diesem Fall Atorvastatin – eine antifibrotische Wirkung – in Form eines signifikant erniedrigten Hydroxyprolin- und Kollagengehalts – erzielt werden (Kang et al., 2007 a). DOCA-salzempfindliche Ratten, die mit Rosuvastatin behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine verminderte Fibrose im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ohne Beeinflussung des erhöhten Blutdrucks (Loch et al., 2006).



Eine der Arbeitsgruppen, die durch operative Verengung der Aorta bei Ratten Bluthochdruck verursacht haben, zeigt, dass am ersten bzw. dritten Tag nach der Operation die Expression der Fibronectin-, Kollagen I- und TGF- $\beta_1$ -mRNA deutlich heraufgesetzt war, was durch Rosuvastatin nicht beeinflusst wurde. Diese Arbeitsgruppe weist selbst darauf hin, dass eine Wiederholung der Versuche mit einer längeren Therapiedauer von über einem Monat sinnvoll wäre (Cirrincione et al., 2006). Es gibt eine Veröffentlichung, in der beschrieben wird, dass Simvastatin keinen Einfluss auf eine Myokardfibrose bei Hamstern mit einer genetisch bedingten Cardiomyopathie hatte (Abraham et al., 2005). Diese Arbeit lässt sich in diesem Fall nicht nur durch die andere Tierart, die als Modell verwendet wurde, sondern auch dadurch, dass es sich in diesem Fall um eine Fibrose handelt, die – im Gegensatz zu den oben genannten Tiermodellen – nicht durch eine hypertonie-induzierte Hypertrophie verursacht wurde, nur schlecht mit den zuvor genannten vergleichen.

Folgende Veröffentlichungen beschreiben die Wirkung von Pravastatin in Zellkultur: Nishimura et al. (1999) zeigen, dass Pravastatin die durch fetales Kälberserum stimulierte Collagen Typ IV-Sekretion und –mRNA-Expression in menschlichen Mesangiumzellen hemmt. Moiseeva et al. (2007) haben mit diesem Statin die Proliferation von Fibroblasten aus dem Herzen und ihre Transformation zu Myofibroblasten gehemmt sowie die Entwicklung einer Hypertrophie von Kardiomyozyten verhindert. Morikawa-Futamatsu et al. (2006) haben mit Angiotensin II bei neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte Hypertrophie hervorgerufen und dessen Wirkung durch Fluvastatin verhindert. He et al. (2008) verwendeten für ihre Versuche Fibroblasten aus adulten Rattenherzen und induzierten einen Wachstumseffekt – indirekt gemessen als Aufnahme einer radioaktiven Nukleinsäure in die Zellen für eine gesteigerte DNA-Synthese – mittels Arginin-Vasopressin. Die Autoren berichten von einer dosisabhängigen Abschwächung dieses Effekts durch Simvastatin. Merkwürdig erscheint allerdings, dass selbst mit der höchsten verwendeten Simvastatin-Konzentrationen von 10  $\mu\text{mol/l}$ , mit der andere Arbeitsgruppen Apoptose in ihren Zellkulturen ausgelöst haben, keine negativen Effekte beobachtet wurden. Hierauf wird später näher eingegangen.

Interessanterweise konnte 1997 bei Untersuchungen im eigenen Hause zur Charakterisierung der TG(mRen2)27-Ratten nur bei zwei von fünf Tieren eine vermehrte Myokardfibrose festgestellt werden, während die anderen drei Tiere keine Veränderung in ihrem Kollagen-Muster gegenüber den Sprague-Dawley-Kontrollratten aufwiesen (Flesch et al., 1997 a). In deutlich neueren Publikationen zeigt sich eine Myokardfibrose sowohl bei für das Transgen homozygoten (Schellings et al., 2006; de Boer et al., 2004) als auch heterozygoten Ratten (Habibi et al., 2007). Eine weitere Arbeit, die sich mit Versuchen mit dem Aldosteronantagonisten Spironolacton an diesem Rattenmodell befasst, beschreibt ebenfalls eine statistisch signifikante perivaskuläre Fibrose bei den Renin-transgenen Tieren. Leider findet sich kein Hinweis, ob homo- oder heterozygote Ratten verwendet wurden (Stas et al., 2007). Diese Beobachtung lässt – wie auch weitere, weiter unten beschriebene Beobachtungen – vermuten, dass sich dieser transgene Rattenstamm über die Jahre – und damit über unzählige Generationen – verändert hat.

## 4.2. Leistung des Herzens

### 4.2.1. Schlagvolumen

Das mittels Auswertung der MRT-Aufnahmen berechnete und im Vergleich zu den Sprague-Dawley-Kontrollratten deutlich verringerte Schlagvolumen (Schlagvolumen = LVEDV-LVESV; wobei ES für endsystolisch steht) der transgenen Tiere wurde durch die Behandlung mit Atorvastatin signifikant angehoben. Diese Beobachtung passt zu den Angaben von Habibi et al. (2007), dass die mit Hilfe einer Herzultraschalluntersuchung ermittelte Ejektionsfraktion (EF), die aus denselben Grundgrößen – LVEDV und LVESV – nach der Formel

$$EF = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} * 100$$

berechnet wird, durch Rosuvastatin günstig beeinflusst wird. Dies bestätigen Liao et al. (2008), die Atorvastatin verwendet haben. Diese Arbeitsgruppe hat durch Verengung der Aorta Bluthochdruck erzeugt und so eine Hypertrophie des linken Ventrikels verursacht sowie die verbesserte EF ebenfalls mit Hilfe der Echokardiographie nachgewiesen. Auch Osorio et al. (2008) haben bei ihrer

Untersuchung an den Bradykinin-2-Rezeptor-Knockout-Mäusen die EF echokardiographisch ermittelt. Die mit Placebo und vor allem die mit dem NO-Synthase-Inhibitor behandelten Tiere zeigten eine im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verminderte EF. Die Verabreichung von Simvastatin verbesserte die EF in beiden Fällen signifikant, wobei die Tiere, die nur das Statin bekamen, die besseren Werte zeigten.

Andere Autoren geben den entsprechenden zweidimensionalen Parameter – Fractional Shortening (FS) – an und bestätigen eine günstige Beeinflussung durch die Therapie mit einem HMGCoA-Reduktasehemmer (Hasegawa et al., 2003; Abraham et al., 2005; Saka et al., 2006 a). Die oben genannten Habibi et al. (2007) und Liao et al. (2008) geben sowohl EF- als auch FS-Werte an. Lee et al. (2006 a), Saka et al. (2006 b) und Xu et al. (2008) beschreiben keine positive Beeinflussung der FS durch Prava- bzw. Pitavastatin, haben allerdings auch keine signifikante Verschlechterung dieses Parameters durch linksventrikuläre Hypertrophie bei renaler Hypertonie bei Ratten bzw. durch Angiotensin II induzierte linksventrikuläre Hypertrophie bei Mäusen festgestellt. Die FS berechnet sich folgendermaßen:

$$FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} * 100$$

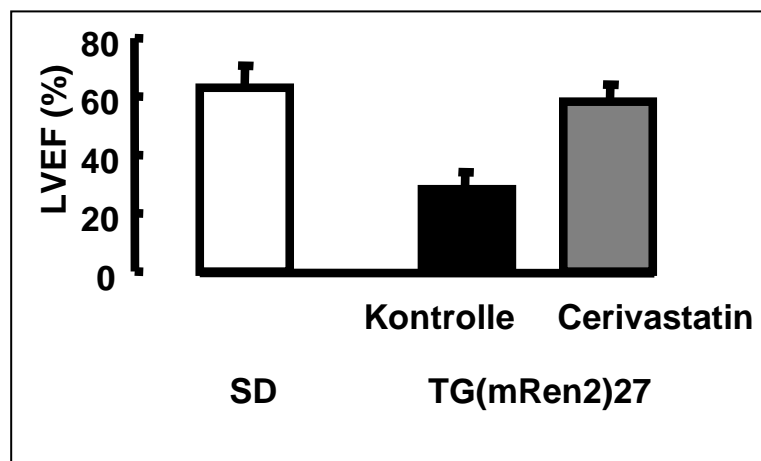
Die mittels Echokardiographie durchgeführten Messungen des enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Volumens und die daraus berechneten Werte für die EF sind bei Richardson et al. (2005) angegeben (siehe oben). Hier bekommt man paradoxerweise den Eindruck, dass sich die hypertrophierten Herzen der unbehandelten Tiere am besten kontrahieren können, da sie die höchsten EF-Werte zeigen, während die behandelten Tiere die niedrigste EF aufweisen. Wenn man aus den Mittelwerten für das endsystolische und enddiastolische Volumen das Schlagvolumen berechnet (jeweils ohne Berücksichtigung des SEM), erhält man Werte, die besser zu der beschriebenen linksventrikulären Hypertrophie passen. Wieder ist lediglich der Wert der scheinoperierten unbehandelten Tiere nicht schlüssig, da er sich kaum von dem der unbehandelten operierten Tiere unterscheidet (siehe oben). Die übrigen Werte spiegeln ein deutlich reduziertes Schlagvolumen bei den hypertrophierten Herzen der unbehandelten Mäuse im

Vergleich zu den Herzen der scheinoperierten und behandelten Tiere wieder, sowie eine Verbesserung durch Statintherapie bei den operierten Mäusen.

Die bereits weiter oben erwähnte Arbeit, in der Kaninchen mit chronischer Herzinsuffizienz als Tiermodell verwendet wurden, gibt die mittels Echokardiographie ermittelte EF an. Hier konnte eine signifikant verminderte EF bei den unbehandelten erkrankten Tieren durch die Therapie mit Simvastatin zwar nicht normalisiert aber signifikant verbessert werden. Eine weitere Tiergruppe, die zusätzlich zur Tachykardie und Simvastatintherapie durch Angiotensin II-Infusionen über eine osmotische Minipumpe in ein Ventrikel des Gehirns beeinflusst wurden, zeigte eine EF, die mittig zwischen den Werten der behandelten und unbehandelten Tieren mit Tachykardie lag (Gao et al., 2005).

Eine 2007 veröffentlichte Studie an Hunden mit chronischer Herzinsuffizienz, die durch Mikroembolie verursacht wurde, beobachtete einen deutlichen Anstieg der Ejektionsfraktion bei den Tieren, die 3 mg/kg Körpergewicht (KGW) Rosuvastatin über drei Monate erhalten hatten. Bei Hunden mit einer deutlich niedrigeren Dosierung (0,5 mg/kg KGW) zeigte sich – wie auch in der Kontrollgruppe – diese Verbesserung so nicht (Zaca et al., 2007).

Diese Beobachtung konnte bei den bereits erwähnten Untersuchungen im eigenen Hause ebenfalls gemacht werden. Die EF war bei den TG(mRen2)27-Ratten auf ca. 30% gesunken und lag bei den Kontrolltieren und den mit Cerivastatin behandelten bei ca. 60%.



**Abbildung 24:** Durch eine Behandlung mit Cerivastatin verbesserte Ejektionsfraktion bei Renin-transgenen Ratten. SD=Sprague-Dawley-Kontrollratten. Abbildung erstellt von Dr. Markus Flesch

Im Gegensatz zu der oben genannten Studie konnte in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie an Patienten mit einer EF unter 40% keine signifikante Verbesserung dieses Parameters sowie der FS durch eine sechsmonatige Therapie mit Rosuvastatin festgestellt werden. Krum et al. (2007) vermuten, dass die Gründe dafür im ausgewählten Patientenkollektiv oder in der Dosierung liegen könnten. Die Autoren geben als weitere mögliche Ursache für einen ausgebliebenen Therapieerfolg an, dass es eventuell durch die übrigen Medikamente, die diese Patienten erhielten, schon zu der maximal möglichen Verbesserung der gemessenen Parameter kam. Diese Begründung erscheint schlüssig, da im Tierexperiment – im Gegensatz zu dieser Studie – i.d.R. die Wirkung von Monotherapien getestet wird.

Eine weitere Studie, deren Resultate Anfang 2008 publiziert wurden, dokumentiert allerdings eine statistisch signifikante Verbesserung der EF bei 23 Patienten von im Durchschnitt  $42 \pm 11\%$  auf  $48 \pm 13\%$  nach einer sechsmonatigen Pitavastatin-Therapie zusätzlich zu der Standard-Therapie (Aoyagi et al., 2008). Orientiert man sich an den potentiellen Begründungen von Krum et al. (2007), könnte eine Ursache für unterschiedliche Statinwirkungen sein, dass verschiedene untersuchte Patientenkollektive unterschiedlich vorbehandelt waren und Statineffekte auch von der vorbestehenden Medikation abhängen. Auch kann der Schweregrad der Erkrankung eine Rolle spielen.

Eine Enttäuschung für Befürworter einer Statintherapie bei Patienten mit Herzmuskelschwäche war allerdings die jüngste große klinische Studie, bei der der Nutzen von Rosuvastatin bei Patienten mit chronischer Herzmuskelschwäche untersucht wurde. In die CORONA-Studie wurden vor allem Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz eingeschlossen. Die im Durchschnitt  $73 \pm 7,1$  Jahre alten Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz hatten nur noch eine EF von durchschnittlich  $31 \pm 7\%$  (Kjekshus et al., 2007). Die Therapie mit Rosuvastatin über ca. anderthalb Jahre hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Mortalität – sowohl aufgrund kardiovaskulärer als auch sonstiger Ursachen (Kjekshus et al., 2007; Angermann und Nitschmann, 2008). Auch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens koronarer Ereignisse (Kjekshus et al., 2007; Angermann und Nitschmann, 2008). Nicht tödlich verlaufende vaskuläre

Ereignisse waren in der mit Rosuvastatin behandelten Gruppe allerdings seltener, und das Risiko, wegen der Herzinsuffizienz oder einer anderen kardiovaskulären Ursache stationär behandelt werden zu müssen, nahm signifikant ab (Kjekshus et al., 2007; Angermann und Nitschmann, 2008).

Auch hier ist kritisch anzumerken, dass es sich bei den Patienten um optimal vorbehandelte Patienten handelt und mögliche günstige Effekte von Statinen durch ähnliche günstige Effekte einer Therapie mit Beta-Blockern, ACE-Hemmern und Aldosteronantagonisten überdeckt wird. Genau hier liegt ja auch der wesentliche Unterschied zwischen der tierexperimentellen Untersuchung mit einer monopharmakologischen Intervention und der klinischen Studie mit dem nicht vermeidbaren polypharmakologischen Ansatz.

#### **4.2.2. Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit**

Zur Ermittlung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie daraus abgeleiteter Parameter – Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in Relation zum systolischen Blutdruck bzw. zum relativen linksventrikulären Gewicht – wurden an den anästhesierten Ratten Millar-Katheter-Messungen durchgeführt. Die Resultate zeigen eine verschlechterte linksventrikuläre Kontraktilität bei den Renin-transgenen Tieren und eine Verbesserung durch die Atorvastatin-Therapie.

Von der weiter oben bereits genannten Forschergruppe um Tsung-Ming Lee (Lee et al., 2005; Lee et al., 2006 a) liegen mittels Millar-Katheter erhobene Resultate aus zwei verschiedenen Arbeiten vor, die sich beide mit der Cholesterin-unabhängigen Wirkung von Pravastatin bei hypertonieinduzierter Hypertrophie befassen. Bei beiden Publikationen kommen die Autoren zu dem Schluss, dass Pravastatin die voranschreitende Hypertrophie unabhängig von hämodynamischen Veränderungen verhindert. In beiden Arbeiten unterscheiden sich die Werte für die Relaxationsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Gruppen – bis auf eine einzelne Ausnahme – nicht signifikant voneinander, wobei die Gruppe der unbehandelten Ratten mit Myokardhypertrophie jeweils im Trend die höchste Relaxationsgeschwindigkeit zeigt. Bei der Kontraktionsgeschwindigkeit unterscheiden sich jeweils lediglich die Werte der Kontrolltiere von denen der

unbehandelten Tiere signifikant voneinander, allerdings nicht so wie erwartet, dass die Kontrollgruppe eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit aufweist, sondern umgekehrt. Es haben wiederum die unbehandelten Tiere mit Hypertonie die im Trend höchsten Werte bzw. – in der älteren Veröffentlichung – die mit Pravastatin und Mevalonat behandelten, wodurch die Wirkung des Pravastatins quasi aufgehoben wurde. Dieselbe Arbeitsgruppe hat sich in einer ebenfalls 2006 (b) erschienenen Veröffentlichung mit einer Fragestellung befasst, die das oben genannte Thema nur peripher betrifft: In dieser Arbeit ging es um die Wirkung von einer gleichzeitigen AT<sub>1</sub>- Rezeptor- Blockade und HMGCoA-Reduktase-Hemmung auf das linksventrikuläre Remodeling nach einem Infarkt. Hier liegen Resultate zur Kontraktilität der Herzen vor, bei denen die Kontrolltiere die beste und die unbehandelten infarzierten Tiere die schlechteste Kontraktilität zeigen. In diesem Fall kommt es durch die Behandlung mit Pravastatin ohne AT<sub>1</sub>- Rezeptor- Blockade zu einer geringfügigen Verbesserung der Werte.

Xia Zheng und Shen-Jiang Hu haben isolierte Rattenherzen im Langendorff-Apparat mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung, der Simvastatin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde, perfundiert (2005). In einer weiteren, ein Jahr darauf erschienenen Veröffentlichung wurde diese Arbeit um Ischämie-Reperfusion-Versuche ergänzt (2006). In beiden Publikationen hatte die niedrigste Simvastatin-Konzentration von 1 µmol/l keinen Einfluss auf die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, während die höheren Dosierungen die entsprechenden Parameter ansteigen ließen und die höchste Dosierung von 100 µmol/l nach einem vorübergehenden Anstieg der Kontraktilität zum plötzlichen Herztod nach vierzehn bis zwanzig Minuten führte. Auch nach Ischämie kam es zu einer verbesserten Kontraktilität der Herzen durch die mittleren Simvastatin-Dosierungen. Eine vor der Ischämie durchgeführte „Behandlung“ der isolierten Herzen mit 3 µmol/l zeigte – im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen – eine kardioprotektive Wirkung.

Die bereits erwähnte Arbeit von Liao et al. (2008) zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit. Bei der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit unterscheiden sich lediglich die Kontrolltiere von den mit Atorvastatin behandelten, operierten Mäusen signifikant voneinander. Diesen

Werten nach hätten die zuletzt genannten Tiere die höchste maximale Relaxationsgeschwindigkeit. Der Kontraktilitätsindex, der aus der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit dividiert durch den Druck zu der Zeit der maximalen Kontraktion berechnet wurde, gibt allerdings an, dass die Kontrolltiere – sowohl unbehandelt als auch mit Atorvastatin behandelt – die beste Kontraktilität zeigen und die operierten unbehandelten Mäuse die schlechteste. Die mit Atorvastatin behandelten operierten Tiere weisen ein zwischen beiden Werten liegendes Resultat auf.

Im eigenen Hause konnte eine Aussage gemacht werden, die der von Liao et al. (2008) entspricht. Hier zeigten allerdings bei den Renin-transgenen Tieren schon die linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit selbst – ohne Berechnung des Kontraktilitätsindexes – eine deutliche Verminderung sowohl der Kontraktions- als auch der Relaxationsgeschwindigkeit. In der Gruppe der mit Cerivastatin behandelten Tiere entsprachen diese Werte quasi denen der Kontrollgruppe. (Abbildung 25)

Cirrincione et al. (2006) haben einen Tag nach der Aortenkonstriktion noch keine Unterschiede bezüglich der Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt. Am dritten Tag nach der Operation zeigt sich eine signifikante Verschlechterung beider Parameter, die durch das Rosuvastatin nicht beeinflusst wird. Diese Arbeitsgruppe gibt an, dass die Therapiedauer darauf ausgelegt war, kurzfristige Veränderungen in der Expression von extrazellulären Matrix-Genen im linken Ventrikel zu untersuchen. Es ist also möglich, dass eine langfristig angelegte Therapie eine Wirkung auf diese Parameter gezeigt hätte.

Bis hierhin kann zusammenfassend festgehalten werden, dass HMGCoA-Reduktasehemmer im Falle einer druckinduzierten Myokardhypertrophie eine antihypertrophe und antifibrotische Wirkung entfalten sowie die hämodynamische Situation verbessern. Eine gesteigerte Kontraktilität kann somit die Folge einer verminderten Fibrose sein.



#### 4.2.3. Blutdruck

Der systolische Blutdruck der transgenen Ratten war wie zu erwarten signifikant gegenüber den Sprague-Dawley-Kontrollratten erhöht. Bereits Mullins et al. (1990), die diese transgenen Ratten entwickelt hatten, stellten trotz niedriger Plasmapreninspiegel die Ausbildung einer fulminanten Hypertonie bei diesen Tieren fest, so dass sie als repräsentatives Modell für Bluthochdruck-assoziierte Erkrankungen verwendet werden konnten.

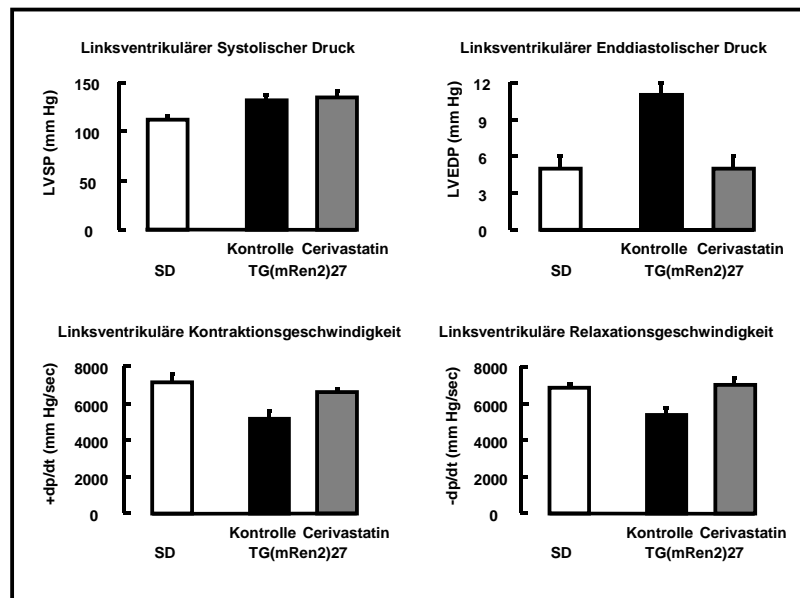
In der vorliegenden Arbeit wurde der erhöhte systolische Blutdruck der transgenen Tiere wie zu erwarten nicht durch die Therapie mit Atorvastatin beeinflusst.

Zur Beeinflussung des mittels Millar-Katheter gemessenen linksventrikulären enddiastolischen bzw. endsystolischen Drucks (LVEDP bzw. ESP) durch HMGCoA-Reduktasehemmer gibt es widersprüchliche Aussagen. So geben Lee et al. (2005, 2006 a) in beiden bereits genannten Arbeiten mit spontan hypertensiven Ratten bzw. mit den Ratten mit renovaskulärer Hypertonie keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen bezüglich des LVEDP an. Ihren Messungen nach wird der jeweils gegenüber den Kontrolltieren bei den unbehandelten Tieren signifikant erhöhte LVESP durch die Statintherapie signifikant gesenkt. Im Gegensatz dazu berichten Liao et al. (2008), bei deren Messungen sowohl LVSP als auch LVEDP bei den unbehandelten operierten Tieren erhöht war, von keinem Einfluss des Atorvastatins auf den LVSP. Hier wurde der LVEDP durch den HMGCoA-Reduktasehemmer gesenkt. Bei den oben bereits beschriebenen Kaninchen zeigte der Parameter LVSP keine signifikant unterschiedlichen Werte zwischen den einzelnen Gruppen. Lediglich im Trend war bei den „Angiotensin II-Tieren“ der LVSP am höchsten, bei den unbehandelten tachykarden Tieren am zweithöchsten und bei den Kontrolltieren am niedrigsten. Die Werte der tachykarden Tiere mit Statintherapie lagen zwischen denen der Kontrolltiere und denen der unbehandelten tachykarden Kaninchen. Hier lieferten die Messungen des LVEDP signifikant unterschiedliche Werte, die sich ansonsten wie beim LVSP verhielten (Gao et al., 2005).

Auch die Arbeitsgruppe, die mit den Bradykinin-2-Rezeptor-Knockout-Mäusen gearbeitet hat (Osorio et al., 2008), führte Messungen mittels Millar-Katheter durch.

Sie geben den systolischen Blutdruck an, der sich zwischen den Wildtyp- und den mit Placebo oder Simvastatin behandelten Knockout-Mäusen nicht signifikant unterscheidet. Die Knockout-Mäuse, die den NO-Synthase-Hemmer verabreicht bekommen haben, zeigten einen erhöhten Blutdruck, der in der Tiergruppe, die mit einer Kombination aus dem NO-Synthasehemmer und Simvastatin behandelt wurden, nur im Trend niedriger war, also nicht nennenswert beeinflusst wurde.

Bei denen vor Jahren im eigenen Hause erhobenen Daten konnte kein Einfluss des Cerivastatins auf den LVSP festgestellt werden. Der LVEDP war bei den unbehandelten Renin-transgenen Tieren deutlich erhöht. Durch die Behandlung mit Cerivastatin wurde dieser Parameter normalisiert.



**Abbildung 25:** Linksventrikulärer systolischer und enddiastolischer Druck sowie linksventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit von zwölf Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten (SD), Renin-transgenen Ratten und transgenen Ratten mit vorhergehender Behandlung mit Cerivastatin. Abbildung erstellt von Dr. Markus Flesch

Die Arbeit von Cirrincione et al. (2006) zeigt einen Blutdruckanstieg einen Tag nach der Operation in allen Gruppen, in denen die Aorta verengt wurde. Drei Tage nach der Operation ist seltsamerweise kein nennenswerter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen mehr festzustellen und der Blutdruck der operierten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten nicht signifikant erhöht.

In den ebenfalls bereits genannten Arbeiten mit isolierten Rattenherzen wird der „left ventrikular developed pressure“ – LVDP – angegeben (Zheng und Hu, 2005 und 2006). Dieser verhielt sich in jedem Punkt wie die Kontraktions- bzw. die Relaxationsgeschwindigkeit (siehe oben). In diesem Fall stieg also der Druck durch die Statinwirkung an. Da es sich aber um keine vollständigen Organismen handelt, ist ein direkter Vergleich mit den anderen Veröffentlichungen nur bedingt möglich.

Weitere Arbeitsgruppen haben den systolischen Blutdruck von Ratten mittels Anlegens einer Manschette an deren Schwanz gemessen (tail-cuff-Methode: Pfeffer et al., 1971). Diese Methode hat den Vorteil, dass sie auch bei nicht-anästhesierten oder –sedierten Tieren angewendet werden kann. Auch bei dieser Methode gibt es unterschiedliche Aussagen bezüglich des Einflusses der Statine. So berichten fünf Arbeitsgruppen, von denen drei spontan hypertensive Ratten (Wassmann et al., 2001; Zhai et al., 2008 und Kang et al., 2007 b) und eine salzempfindliche Dahl-Ratten (Zhou et al., 2004) als Tiermodell mit Hypertonie nutzten, bzw. Sprague-Dawley-Ratten einer operativen Aortenkonstriktion unterzogen hatten (Liu et al., 2008) von einer statistisch signifikanten Absenkung des erhöhten systolischen Blutdrucks durch die Behandlung mit einem HMGCoA-Reduktasehemmer. In den Versuchen mit den salzempfindlichen Dahl-Ratten wurde – wie oben bereits beschrieben – bei einem Teil der Ratten nach einer sechswöchigen Fütterung der salzreichen Diät auf ein deutlich salzärmeres Futter umgestellt. Der Blutdruck dieser Tiere sank dadurch nicht. Erhielten sie zusätzlich zu dieser Fütterungsumstellung Atorvastatin, normalisierte sich der Blutdruck vollständig (Zhou et al. 2004).

Die bereits genannten Arbeiten von Habibi et al., Hasegawa et al. und Xu et al., die 2008 erschienen sind, lassen keinen statistisch signifikanten Einfluss von HMGCoA-Reduktasehemmern auf den erhöhten systolischen Blutdruck der Renin-transgenen Tiere, salzempfindlichen Dahl-Ratten bzw. mit Angiotensin II behandelten Mäusen erkennen. Dieses wird von weiteren ebenfalls bereits erwähnten Autoren bestätigt (Saka et al., 2006 a und b; Loch et al., 2006; Morikawa-Futamatsu et al., 2006; Takemoto et al., 2001).

#### **4.2.4. Herzfrequenz**

Die Herzfrequenz wurde in der vorliegenden Arbeit weder durch die Auswirkungen des Transgens noch durch die Therapie mit Atorvastatin nennenswert beeinflusst. Auch in den bereits erwähnten Veröffentlichungen, in denen verschiedene Tiermodelle Verwendung fanden, ist zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Herzfrequenz zu sehen, wenn sie angegeben wurde (Lee et al., 2005, 2006 a und 2006 b; Liao et al., 2008; Xu et al., 2008; Cirrincione et al., 2006 und Zhai et al., 2008). Lediglich bei den Herzfrequenzwerten, die Richardson et al. (2005) angeben, ist eine etwas größere Abweichung bei der Gruppe der mit Simvastatin behandelten Tiere, deren Aorta operativ verengt wurde, zu verzeichnen. Diese Tiere haben eine niedrigere Herzfrequenz als die anderen. Dies scheint aber weder durch die Operation verursacht worden zu sein noch durch die Therapie mit Simvastatin, da ansonsten vergleichbare Resultate in einer der anderen Gruppen hätten auftreten müssen.

### **4.3. Resultate auf molekularer Ebene**

#### **4.3.1. Kalzium-Homöostase regulierende Proteine Sarko(endo)plasmatische-Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und Phospholamban**

Vor über zehn Jahren wurden im eigenen Hause Versuche mit den Renin-transgenen Ratten durchgeführt, die auch für die vorliegende Arbeit als Tiermodell verwendet wurden (TG(mREN2)27). Damals zeigte sich bei den genetisch veränderten Tieren eine statistisch signifikante Herabregulation der Sarko(endo)plasmatischen-Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Isoform 2a) (SERCA2a) und deren wichtigstem Regulatorprotein, dem Phospholamban sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Flesch et al., 1997 a und Flesch et al., 1997 b).

Die SERCA pumpt in das Zytosol der Herzmuskelzellen freigesetztes Kalzium nach der Kontraktion in den intrazellulären Kalziumspeicher, das sarkoplasmatische Retikulum, in einem energieabhängigen Prozess zurück. Phospholamban hemmt in unphosphoryliertem Zustand die Aktivität der SERCA. Wird Phospholamban phosphoryliert, dissoziiert es von der SERCA ab und bewirkt so indirekt über eine Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität der SERCA eine Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (Tada et al., 1982). Die

Phosphorylierung von Phospholamban erfolgt in erster Linie durch die Proteinkinase A am Serinrest 16. Es kann aber auch über die Kalzium-Kalmodulin-abhängige Proteinkinase und in geringerem Maße durch die Proteinkinase C sowie einer cGMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden (Tada et al., 1974; Raeymaekers et al., 1988; Kirchberger et al., 1974)

Die SERCA2a spielt also eine nicht unbedeutende Rolle bei der Kontraktion des Herzens, und eine veränderte Expression von SERCA und Phospholamban wirkt sich auf die Kontraktilität der Ventrikel aus. Beim insuffizienten bzw. versagenden menschlichen Herzen findet sich eine verminderte Aktivität der SERCA2a (Schwinger et al., 1995; Flesch et al., 1996). So war es naheliegend zu untersuchen, ob sich eine Therapie mit Atorvastatin nicht nur durch einen veränderten Kollagengehalt des linken Ventrikels sondern auch durch eine Veränderung im Gehalt des Myokards an SERCA2a und/oder Phospholamban bzw. dessen Phosphorylierungsgrades auswirkt.

Die Western-Blot-Untersuchungen erbrachten ein Trendergebnis, das bei den transgenen Ratten eine Herabregulation des Gehalts an SERCA2a im Vergleich zu den Kontrolltieren sowie eine Normalisierung des SERCA2a-Proteingehalts durch die Atorvastatin-Behandlung zeigte. Keine erwartete Herabregulation fand sich bei den transgenen Ratten für Phospholamban, und auch dessen Phosphorylierungsgrad am Serinrest 16 blieb unbeeinflusst.

Die bereits erwähnte Arbeit von Senthil et al. (2005) befasst sich nur mit der Exprimierung der SERCA2a-mRNA, nicht aber mit der von Phospholamban und lässt auch den SERCA2a-Proteingehalt unberücksichtigt. Eine stark herabgesetzte Exprimierung der SERCA2a-mRNA wurde bei den transgenen Kaninchen durch Atorvastatin wieder heraufreguliert.

Die Beobachtung, dass der Proteingehalt an Phospholamban zwischen den einzelnen Tiergruppen unverändert blieb während die SERCA-Proteinmenge variierte, wird von zwei neueren chinesischen Publikationen bestätigt. Kang et al. (2007 b) haben spontan hypertensive Ratten und als Kontrolltiere Wistar-Kyoto-Ratten verwendet. In ihrer 2007 (b) erschienenen Veröffentlichung wird eine

statistisch signifikante Herabregulation sowohl des SERCA-mRNA- als auch des -Proteingehalts bei den hypertensiven Ratten gezeigt, die durch die Therapie mit Atorvastatin aufgehoben wurde. Auch die Aktivität der SERCA wurde dementsprechend verändert. Phospholamban ist hier nicht reguliert. Xia Zheng und Shen-Jiang Hu (2005 und 2006) haben isolierte Rattenherzen im Langendorff-Apparat als Modell benutzt (siehe oben). Sie geben zwar an, dass der Proteingehalt an SERCA, Phospholamban und dem Ryanodin-Rezeptor durch die verschiedenen Simvastatin-Dosierungen unbeeinflusst blieb, aber der Gehalt an SERCA- und Ryanodin-Rezeptor-mRNA durch den Wirkstoff in einer Dosierung von 3, 10 und 30  $\mu\text{mol/l}$  – bei unveränderten Phospholamban-mRNA-Konzentrationen – anstieg. Auch wurden neonatale Kardiomyozyten von der Ratte in ihrer Phospholamban-Genexpression durch Simvastatin nicht beeinflusst, während die Expression von SERCA und dem Ryanodin-Rezeptor anstieg (2005).

In diesen Arbeiten finden sich allerdings Unstimmigkeiten. So geben Kang et al. (2007 b) an, das lipophile Atorvastatin den Ratten in destilliertem Wasser gelöst verabreicht zu haben und destilliertes Wasser als Placebo verwendet zu haben. Die lipophile Substanz Atorvastatin wurde für die vorliegende Arbeit – wie vom Hersteller empfohlen – in einer Methylzellulose-Lösung gelöst verabreicht, um die Eingabe einer öligen Lösung zu vermeiden. Der Lösungsprozess in der Methylzellulose-Lösung verlief unter intensivem Schütteln nur langsam. Dass diese fettlösliche Substanz einigermaßen homogen in einer arbeitstechnisch vertretbaren Zeit in Wasser verteilt worden sein soll und dass Ratten eine wiederholte Gabe einer extrem hypoosmotischen Flüssigkeit toleriert haben sollen, erscheint recht fraglich. Die isolierten Rattenherzen und Zellkulturen, mit denen Xia Zheng und Shen-Jiang Hu (2005 + 2006) gearbeitet haben, wurden Simvastatin-Konzentrationen ausgesetzt, die Konzentrationen entsprachen oder sogar deutlich überschritten, die in Zellkulturen anderer Arbeitsgruppen Apoptose ausgelöst haben. Beispielsweise seien hier El-Ani und Zimlichman (2002) genannt, die mit Simvastatin-Konzentrationen zwischen 0,1 und 3  $\mu\text{mol/l}$  gearbeitet haben, sowie Demyanets et al. (2006), bei denen Atorva-, Fluva- und Simvastatin in Konzentrationen von 0,5 bzw. 5  $\mu\text{mol/l}$  zum Einsatz kamen. Die als zweites genannte Arbeitsgruppe sagt selbst, dass die von ihnen verwendeten Dosierungen höher liegen als bei Patienten beobachtete Plasmaspiegel der entsprechenden Wirkstoffe. Zur Apoptose-

Auslösung durch HMGCoA-Reduktasehemmer sei auch auf den Abschnitt „Ergebnisse von In-Vitro-Untersuchungen“ verwiesen.

Im Hinblick auf die Regulation von SERCA und Phospholamban wird von einer im Jahre 1999 auf deutsch erschienen Arbeit, die sich ebenfalls mit den transgenen, hypertensiven TG(mREN2)27-Ratten befasst, berichtet, dass eine signifikante Herabregulation des SERCA-Proteins und eine Abnahme des Phospholamban-Proteins nur im Trend bei diesen Tieren im Vergleich zu den Sprague-Dawley-Kontrollratten vorlag (Zobel und Schwinger, 1999). In einer weiteren Publikation desselben Autors wurde ebenfalls eine reduzierte SERCA-Protein-Expression bei TG(mREN2)27-Ratten festgestellt, wobei sich die Phospholamban-Protein-Konzentration zwischen diesen Ratten und Sprague-Dawley-Kontrollratten nicht unterschied. Unerwarteterweise war hier die SERCA-Aktivität ebenfalls zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich (Zobel et al., 1998). Diese Ergebnisse bezüglich des Proteingehalts an SERCA2a und Phospholamban, die nach den oben genannten Publikationen von Flesch et al. und vor den in dieser Arbeit ermittelten Resultate erhoben wurden, liegen nicht nur zeitlich sondern quasi auch inhaltlich dazwischen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Veränderung des Phänotyps der Renin-transgenen Ratten über die Jahre hinweg sein, bei der sich zunächst die Phospholamban-Protein-Gehalte an die der Sprague-Dawley-Kontrollratten angeglichen haben und nun auch der Unterschied in der Konzentration an SERCA-Protein abnimmt. Über diese unzähligen Generationen könnte durch eine oder mehrere kleinere Mutationen quasi eine Anpassung an die Nachteile durch die ursprüngliche Mutation – das Transgen – stattgefunden haben. Passend dazu wäre eine mündliche Mitteilung von Stephane Heymans, wonach die homozygoten Renin-transgenen Ratten, mit denen er gearbeitet hat, mittlerweile eine längere Überlebenszeit haben als noch vor etwa einem Jahrzehnt. Es wäre logisch, wenn es dann auch bei den heterozygoten Individuen länger dauern würde, bis sich eine Herzinsuffizienz in ihrer vollen Ausprägung einstellt. Dies würde auch erklären, warum die linken Ventrikel der transgenen Ratten des Cerivastatin-Versuchs eine Dilatation zeigten, während die aus der vorliegenden Arbeit nicht dilatiert waren, obwohl die Tiere ein gleiches Alter hatten. Es wäre gut möglich, dass sich die Dilatation einige Zeit später entwickelt hätte. Eventuell hätte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf den SERCA-Proteingehalt zwischen den transgenen

und den Sprague-Dawley-Kontrollratten noch zu einem späteren Zeitpunkt gezeigt. Eine Arbeit, in der eine Hypertrophie des linken Ventrikels durch Aorten-Konstriktion herbeigeführt wurde, hat den SERCA-Proteingehalt acht und sechzehn Wochen nach der Operation ermittelt. Nach acht Wochen gab es noch keinen signifikanten Unterschied zu den scheinoperierten Kontrollratten, nach sechzehn Wochen war ein solcher dann festzustellen (Qi et al., 1997). Vielleicht sind die zeitlichen Abläufe bei heterozygoten TG(mREN2)27-Ratten mittlerweile ähnlich lang. Es wäre auch interessant zum jetzigen Zeitpunkt (2008) noch einmal den Gehalt an SERCA-Protein zwischen zwölf Wochen alten heterozygoten Renin-transgenen und Sprague-Dawley-Kontrollratten zu vergleichen und zu überprüfen, ob überhaupt noch ein Unterschied festgestellt werden kann.

#### **4.3.2. Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38**

Ein zur Ausbildung einer Myokardhypertrophie und der chronischen Herzinsuffizienz beitragender, bedeutender Signaltransduktionsweg stellt die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase)-Kaskade dar. Angiotensin II entfaltet seine Wirkung auch über diesen Signaltransduktionsweg (Thomas et al., 1996). Es gibt drei MAP-Kinase-Subfamilien: die c-JUN N-terminalen Kinasen, die p38-Kinasen und die extrazellulär responsiven Kinasen (ERK). ERK 1 und ERK 2 sind auch unter dem Namen p42 und p44 bekannt. In phosphoryliertem Zustand sind MAP-Kinasen aktiviert.

Es gibt Veröffentlichungen, in denen gezeigt wird, dass hypertrophierte Herzen bzw. Herzen von Tieren mit einer ausgeprägten Hypertonie in verschiedenen Tiermodellen eine vermehrte Phosphorylierung und somit eine gesteigerte Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen aufweisen (Sudgen, 2001; Hayashida et al., 2001; Behr et al., 2001; Wang et al., 1998; Kacimi und Gerdes, 2003). In einer dieser Publikationen wurde nur die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 bei spontan hypertensiven, zum Schlaganfall neigenden Ratten, nicht aber die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p44/42 über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis zur Dekompensation beobachtet (Behr et al., 2001). Hier zeigte sich, wie auch in der Arbeit von Hayashida et al., der bei salzempfindlichen Dahl-Ratten durch die Fütterung einer salzreichen Diät (8% NaCl) eine Hypertonie



und darüber eine linksventrikuläre Hypertrophie ausgelöst hatte, dass diese MAP-Kinase vor allem während der Entwicklung der Hypertrophie phosphoryliert war. Der Phosphorylierungsgrad nahm dann im Laufe der chronisch werdenden Hypertrophie bis zum Erreichen des Endstadiums der Herzinsuffizienz ab (Behr et al., 2001; Hayashida et al., 2001). Die MAP-Kinasen p44/42 blieben über den ganzen Zeitraum hinweg gleichermaßen unbeeinflusst und zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Hayashida et al., 2001). Auch Kacimi und Gerdes (2003) beobachteten mittels Western-Blot-Untersuchungen zunächst eine vermehrte Aktivierung sowohl von p44/42 als auch von JNK und p38 bei gleichbleibenden Gesamt-MAP-Kinasen-Spiegeln beim Vorliegen einer linksventrikulären Hypertrophie und schließlich eine herabgesetzte Phosphorylierung dieser MAP-Kinasen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nach weiterem Voranschreiten der Erkrankung.

Auch im menschlichen insuffizienten Myokard wurde im Vergleich zum gesunden Myokard eine verstärkte Aktivierung von p38 nachgewiesen (Cook et al., 1999; Haq et al., 2001). Eine Untersuchung an menschlichen Gewebeproben gibt auch eine zusätzlich vermehrte Aktivierung von p44/42 bei versagenden Herzen, nicht aber bei hypertrophierten, nicht versagenden Herzen an (Haq et al., 2001). In einer 2001 veröffentlichten Untersuchung an Herzgewebeproben von Patienten, denen ein Unterstützungssystem zur Verbesserung der Pumpleistung ihres insuffizienten Herzens (left ventricular assist device, LVAD) eingepflanzt wurde, wurde der Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen p44/42 und p38 mit dem Aktivierungsgrad dieser MAP-Kinasen in Herzgewebeproben von Patienten ohne LVAD verglichen. Außerdem wurde die MAP-Kinasen-Aktivierung von weiteren sechs Patienten bestimmt, von denen jeweils Proben vorlagen, die vor und nach der Einpflanzung des LVAD gewonnen wurden. Bei den zuletzt genannten Proben konnte eine signifikante Verkleinerung des Volumens der Kardiomyozyten sowie eine signifikante Abnahme der Apoptoserate durch die LVAD-Unterstützung festgestellt werden. Bei den Proben von Patienten ohne LVAD war p44/42 vermehrt phosphoryliert, bei denen von Patienten mit LVAD war p38 deutlich stärker aktiviert (Flesch et al., 2001).

Diese unterschiedlichen Beobachtungen ließen vermuten, dass auch bei dem hier verwendeten Tiermodell eine oder beide der genannten MAP-Kinasen einen Unterschied im Aktivierungsgrad zu den Kontrollratten zeigen sollte, der durch die Wirkung des Atorvastatins beeinflusst sein könnte.

Die durchgeführten Bestimmungen des Gehalts an phosphoryliertem und damit aktiviertem p44/42 mittels Western-Blot-Technik ergaben eine statistisch signifikante Zunahme bei den transgenen Ratten, die kein Atorvastatin erhalten hatten. Dieser Effekt wurde durch die Therapie mit Atorvastatin zwar nur teilweise, aber doch statistisch signifikant, aufgehoben.

Dieser Befund wird von einer oben bereits erwähnten Arbeit aus dem Jahre 2006, bei der salzempfindliche Dahl-Ratten als Tiermodell verwendet wurden, bestätigt. Bei den unbehandelten, kochsalzreich gefütterten Dahl-Ratten zeigte sich eine signifikant vermehrte Phosphorylierung der p44/42-MAP-Kinase. Die Tiergruppe, die Pitavastatin in einer niedrigen Dosierung erhalten hatte, zeigte zwar einen im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant erhöhten Phosphorylierungsgrad, der aber – ebenfalls signifikant – unter dem der unbehandelten Gruppe lag. Die Werte der mit einer hohen Pitavastatin-Dosis behandelten Ratten entsprachen quasi denen der Kontrollgruppe (Saka et al., 2006 b). Auch Senthil et al. (2005) zeigten an den von ihnen verwendeten transgenen Kaninchen einen signifikanten Anstieg des Aktivierungsgrades dieser MAP-Kinase sowie eine signifikante Abschwächung dieses Effekts durch Atorvastatin. Hier wurde außerdem die Anzahl apoptotischer Zellen ermittelt, die bei den unbehandelten transgenen Tieren stark angestiegen war. Dies wurde durch Atorvastatin vollständig aufgehoben.

Die 2008 erschienene Veröffentlichung von Liao et al. zeigt eine signifikant vermehrte Phosphorylierung dieser MAP-Kinase bei Mäusen, die eine Hypertrophie des Herzens durch Aorten-Konstriktion entwickelt haben. Auch hier kam es zu einer unvollständigen aber signifikanten Normalisierung dieses Parameters. Auf die scheinoperierten Tiere hatte das Atorvastatin in diesem Punkt – wie bei den anderen Parametern auch – keinen Einfluss.

Untersuchungen an einem transgenen Rattenmodell, das sowohl das menschliche Renin- als auch das Angiotensinogen-Gen exprimiert, führten zu analogen Ergebnissen. Auch hier verhinderte die Gabe eines HMGCoA-Reduktasehemmers – in diesem Fall Cerivastatin – die vermehrte Phosphorylierung bei den transgenen Tieren (Dechend et al., 2001 a).

Bei den Bradykinin-2-Rezeptor-Knockout-Mäusen waren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sowohl JNK und p38 als auch p44/42 vermehrt phosphoryliert (Osorio et al., 2008). Die Hemmung der NO-Synthase hatte keine Auswirkung darauf. Bei diesem Tiermodell zeigte sich keinerlei Einfluss der Therapie mit Simvastatin auf den Phosphorylierungsgrad von p44/42, wohl aber auf den der beiden Stress-aktivierten Proteinkinasen. Dieser wurde statistisch signifikant abgesenkt.

Nicht nur bei p44/42 sondern auch bei der MAP-Kinase p38 zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine statistisch signifikant vermehrte Phosphorylierung durch die Überexprimierung des Transgens. Diese wurde – wie auch in der zuvor genannten Arbeit von Osorio et al. (2008) – durch die Behandlung mit dem Statin ebenfalls nur teilweise, aber statistisch signifikant aufgehoben.

So kann angenommen werden, dass die antihypertrophe Wirkung des Atorvastatins zumindest zum Teil durch die Unterdrückung der Hypertrophie-fördernden Signaltransduktionswege, in die p38 und p44/42 involviert sind, verursacht wird. Da v.a. p38 auch über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Apoptose auslösen kann, ist eventuell zu vermuten, dass Atorvastatin über diesen Weg auch antiapoptotische Wirkung entfaltet.

Dieses Resultat scheint nicht zu der Beobachtung von de Boer et al. (2004) zu passen, der ebenfalls bei TG(mREN2)27-Ratten den Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen p44/42 und p38 ermittelt hat. Die Ergebnisse seiner Arbeitsgruppe zeigen einen statistisch signifikant heraufgesetzten Phosphorylierungsgrad von p44/42 sowohl bei sechs als auch bei zehn Wochen alten Renin-transgenen Tieren, wohingegen p38 im Vergleich zu den Sprague-Dawley-Kontrollratten bei den sechs Wochen alten transgenen Ratten im Trend vermehrt und bei den zehn Wochen alten

Tieren im Trend vermindert phosphoryliert war. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich in diesem Fall um homozygote Tiere handelt. Deren linksventrikuläre Hypertrophie müsste in einem Alter von zehn Wochen schon weiter vorangeschritten sein als die der zwölf Wochen alten heterozygoten Tiere, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. In Verbindung mit den oben genannten Beobachtungen, wonach die Aktivierung der p38 MAP-Kinase im Verlauf der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz abnimmt, erscheinen obige Aussagen wiederum plausibel.

## **4.4. Ergebnisse von In-Vitro-Untersuchungen**

### **4.4.1. Einfluss von Angiotensin II und Tumornekrosefaktor $\alpha$ auf die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38**

Dass isolierte Kardiomyozyten in Zellkultur auf Stress-Reize mit einer vermehrten Phosphorylierung der MAP-Kinasen reagieren, ist gut dokumentiert (Sugden und Clerk, 1998; Clerk und Sugden, 2000; Ruwhof und van der Laarse, 2000; Yang et al., 2005; Sekiguchi et al., 2004, Heller Brown et al., 2006). So war die Vermutung naheliegend, dass die im Tiermodell gezeigte Wirkung des Atorvastatins auf den Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen p44/42 und p38 auch *in vitro* gezeigt werden kann.

Ang II, das über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems auch in den transgenen Ratten vermehrt exprimiert wird, wird *in vitro* von Kardiomyozyten freigesetzt, wenn diese mechanisch gedehnt werden, und führt über seine Bindung an den Angiotensin-II-Subtyp-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen (Yamazaki et al., 1995). In einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l löste es sowohl bei neonatalen als auch bei adulten, aus dem Ventrikel gewonnenen Kardiomyozyten bei einer 24stündigen Inkubation Apoptose aus (Cigola et al., 1997; Kajastura et al., 1997). An kultivierten HL-1-Zellen aus dem Herzvorhof von Mäusen wurde gezeigt, dass durch Ang II in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l die Expression der  $\alpha 1C$ -Untereinheit des L-Typ-Kalzium-Kanals über einen Signaltransduktionsweg über Proteinkinase C und reaktionsfähigen Sauerstoff heraufgesetzt wird. Dies wurde nicht nur durch AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker sondern auch

durch Simvastatin verhindert (Tsai et al., 2007). *In vivo* konnte mit Ang II eine Proliferation von Herzmuskelzellen ausgelöst sowie eine intramyokardiale perivaskuläre Fibrose hervorgerufen werden (McEwan et al., 1998) und *in vitro* in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l eine Hypertrophie von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (Morikawa-Futamatsu et al., 2006; Oi et al., 1999).

Ang II induziert die Bildung und Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  im adulten Herzen, was sowohl im isolierten Herzen von der Katze als auch *in vitro* an adulten Herzmuskelzellen nachgewiesen werden konnte (Kalra et al., 2002). Hier zeigte sich – wie auch in der vorliegenden Arbeit – eine Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l als völlig ausreichend, um die untersuchten Effekte hervorzurufen. Da es also Interaktionen zwischen dem Renin-Angiotensin-System und Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  bei der Ausbildung einer Hypertrophie des Herzens gibt (Flesch et al., 2003; Kalra et al., 2002; Sekiguchi et al., 2004), war es naheliegend, auch  $\text{TNF}\alpha$  zur Stimulation der Zellen einzusetzen.

Eine Konzentration von 2 ng/ml verursachte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit schon eine signifikante Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38. Die von zwei anderen Arbeitsgruppen bei In-Vitro-Experimenten verwendeten Konzentrationen lagen mit 10 ng/ml deutlich darüber (Saito et al., 2007; Turner et al., 2007 a) bzw. bewegten sich mit zunehmendem Effekt in einem recht weiten Raum von 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml (Turner et al., 2007 b). Auch Dhingra et al. (2007) haben ihre adulten Kardiomyozyten mit 10 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  inkubiert. Dabei zeigte sich jedoch nur eine vermehrte Aktivierung von p38, während der Phosphorylierungsgrad von p44/42 abnahm.

#### **4.4.2. Einfluss von HMGCoA-Reduktasehemmern auf die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p44/42 und p38 sowie auf Apoptose**

Die im Tierversuch erhobenen Befunde zeigten sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit im Prinzip auch *in vitro*. Allerdings wurde nur die durch  $\text{TNF}\alpha$  verursachte, nicht aber die durch Ang II hervorgerufene Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 durch den Atorvastatin-Einfluss aufgehoben.

Zu In-Vitro-Experimenten liegen zahlreiche Publikationen vor. Auch in zwei der bereits oben genannten Veröffentlichungen, in denen auf die Aktivierung der MAP-Kinasen *in vivo* eingegangen wird, sind ebenfalls Ergebnisse von In-Vitro-Experimenten dargestellt. So zeigen Dechend et al. (2001 a), dass Cerivastatin die Phosphorylierung von p44/42 *in vitro* blockiert, und Liao et al. (2008) haben mit Atorvastatin die vermehrte Aktivierung von p44/42 durch Phenylephrin in neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte abgeschwächt.

In einer weiteren Publikation wird berichtet, dass Lovastatin – im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen – die durch Angiotensin II gesteigerte p44/42-MAP-Kinasen-Aktivität statistisch signifikant gesenkt hat, was durch Mevalonat wieder aufgehoben wurde. Die durch Angiotensin II-Wirkung verursachte Hypertrophie der neonatalen Kardiomyozyten wurde durch das Lovastatin verhindert (Oi et al., 1999). In einem englischsprachigen Auszug eines auf chinesisch erschienen Artikels wird auch eine dosisabhängige Verhinderung einer Hypertrophie von Herzmuskelzellen durch Atorvastatin erwähnt. Die Vergrößerung der Zelloberfläche wurde durch Angiotensin II hervorgerufen (Sheng et al., 2005). Eine dosisabhängige Normalisierung der Zellgröße der durch Angiotensin II hypertrophierten neonatalen Herzmuskelzellen von der Ratte durch Statine wird ebenfalls von Richardson et al. (2005) berichtet. Hier wurden Atorvastatin und Simvastatin eingesetzt. Auch durch Fluvastatin konnte die durch den Einfluss von Angiotensin II verursachte Hypertrophie von kultivierten neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte aufgehoben werden. Durch zusätzliche Zugabe von Mevalonat wurde die Wirkung des Fluvastatins verhindert (Morikawa-Futamatsu et al., 2006). Für diese Arbeit wurde unter anderem die Aktivität der Rho-Kinase ermittelt, die nach einer sechsständigen Angiotensin II-Einwirkung deutlich anstieg. Durch Fluvastatin wurde dies verhindert.

Ito et al. (2004) haben adulte Kardiomyozyten von der Ratte mit Noradrenalin stimuliert. Sie sagen aus, dass Cerivastatin die  $\beta$ -Adrenozeptor-stimulierte Aktivierung von Rac 1 und dadurch die JNK-abhängige Apoptoseauslösung gehemmt hat. Deshalb vermutet diese Arbeitsgruppe, dass die positiven Effekte von Statinen auf das Myokard zum Teil durch Hemmung der Rac 1-abhängigen

Apoptose der Herzmuskelzellen verursacht werden. Zu den p44/42- und p38-MAP-Kinasen liegen leider keine Versuchsergebnisse in dieser Veröffentlichung vor.

Die bereits an anderer Stelle erwähnte Arbeit von He et al. (2008) beschreibt u.a. eine Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase und eine gesteigerte Aktivität der Proteinkinase C sowie die dosisabhängige Abschwächung dieser Effekte durch Simvastatin bei Fibroblasten, die aus Herzen von adulten Ratten isoliert wurden.

In einer Publikation (Kozai et al., 2005) wird ausgesagt, dass Cerivastatin zwar die durch mechanische Dehnung verursachte RhoA-Akkumulation verminderte, aber auf die Phosphorylierung der p44/42-MAP-Kinasen keinen Effekt hatte. Für diese Arbeit sind allerdings keine Kardiomyozyten sondern menschliche, aus der Vena saphena gewonnene glatte Muskelzellen kultiviert worden.

Drei weitere Veröffentlichungen (Turner et al., 2007 a und b; Saito et al., 2007) befassen sich mit durch TNF $\alpha$  induzierten Effekten und deren Beeinflussung durch Simva-, Prava-, bzw. Fluvastatin. Für zwei dieser Veröffentlichungen wurden keine Herzmuskelzellen sondern menschliche Fibroblasten aus Biopsien vom rechten Herzhohr gewonnen (Turner et al., 2007 a und b). Mittels TNF $\alpha$  wurden diese Zellen stimuliert, so dass eine signifikant vermehrte Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6) beobachtet werden konnte (Turner et al., 2007 b). Anhand diverser Versuche mit verschiedenen neutralisierenden Antikörpern zeigten Turner et al. (2007 b) in dieser Arbeit, dass sowohl die IL-6- als auch die Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )-Expression nur über den TNF-RI Subtyp des TNF-Rezeptors ausgelöst und sowohl über den p38-MAP-Kinase-, den NF- $\kappa$ B- als auch den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase(PI3K)/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt wird. An der Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )-Ausschüttung hingegen ist auch der TNF-RII beteiligt. Über den TNF-RI werden hier der p38-MAP-Kinase- und der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg aktiviert, während die IL-1 $\alpha$ -Expression über den NF- $\kappa$ B- Signaltransduktionsweg negativ reguliert wird. p44/42 vermittelt laut dieser Publikation weder die Expression von IL-6 noch von IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ . Simva- und Fluvastatin senkten den durch TNF $\alpha$  induzierten erhöhten IL-6-mRNA-Spiegel signifikant, zeigten aber diesen Effekt auf Protein-Ebene nicht. Turner et al. (2007 b) schlägt vor, zu untersuchen, ob Fibroblasten aus der Herzkammer – einer Region im Herzen, in der weniger TNF $\alpha$  gebildet wird als im

Herzohr – nicht eventuell anders auf eine Stimulation mit TNF $\alpha$  reagieren. Außerdem gehen die Autoren davon aus, dass die Fähigkeit von Statinen, die Ausschüttung von Zytokinen zu reduzieren, durch ihre Effekte auf andere Zelltypen – wie z.B. Kardiomyozyten – verursacht wird. In der Publikation von Saito et al. (2007) geht es zwar primär um die Wirkung von Pravastatin auf den Fett- und Glukosestoffwechsel, es wird aber auch gezeigt, dass die kultivierten neonatalen Kardiomyozyten von der Ratte vor der durch TNF $\alpha$  verursachten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bewahrt werden. Auch hier wird gezeigt, dass diese Wirkung durch Mevalonat aufgehoben wird. Für die weitere Veröffentlichung von Turner et al. (2007 a) wurden auch wieder Fibroblasten aus Herzohren vom Menschen isoliert. Auch wurden diese Zellen wieder mit TNF $\alpha$  stimuliert, wodurch die p44/42- und p-38-MAP-Kinasen, nicht aber die JNK aktiviert wurde(n). Durch Simvastatin konnte der Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinasen bei diesen Fibroblasten nicht beeinflusst werden.

Zu diesen Beobachtungen stehen die Resultate einer japanischen Arbeitsgruppe im Widerspruch, die eine vermehrte Phosphorylierung sowohl der p44/42- als auch der p38 MAP-Kinasen durch die Einwirkungen von Atorvastatin auf neonatale Herzmuskelzellen von der Maus dokumentiert haben (Nakajima et al., 2006). Die hier verwendete Atorvastatin-Konzentration von 10  $\mu$ mol/l war allerdings sehr hoch.

Diverse Arbeitsgruppen berichten von Apoptose-auslösenden Effekten von HMGCoA-Reduktasehemmern *in vitro* (Rabkin et al., 2007; Ogata et al., 2002; Li et al., 2002; El-Ani und Zimlichman, 2002; Demyanets et al., 2006; Rabkin und Kong, 2003; Kong und Rabkin, 2002; Rabkin und Tsang, 2008; Kaneta et al., 2003). In diesen Versuchen wurden Konzentrationen der verschiedenen Statine im Medium verwendet, die – wie eine Arbeitsgruppe selbst angibt – deutlich über den Plasmaspiegeln an diesen Stoffen bei Patienten liegt, die mit HMGCoA-Reduktasehemmern behandelt werden (Demyanets et al., 2006). Zu Dosierungsbeispielen sei hier auf die bereits im Abschnitt „Kalzium-Homöostase regulierende Proteine Sarko(endo)plasmatische-Retikulum-Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Phospholamban“ verwiesen. Die Konzentration von Fluvastatin im Blut bzw. Plasma zum Beispiel kann – je nach dem ob es mit oder ohne (fettreiche) Nahrung aufgenommen wurde – relativ stark schwanken, bleibt aber maximal im zweistelligen



ng/ml-Bereich (Deslypere, 1994). Für Pravastatin werden ähnliche Serum-Konzentrationen angegeben (Pan et al., 1990). Nimmt man beispielhaft eine recht hohe Serum-Konzentration an Pravastatin von ca. 30 ng/ml, die so eventuell kurze Zeit nach der Einnahme von 20 mg Pravastatin auftreten kann (Pan et al., 1990), und rechnet dies in mol/l um, so kommt man bei dem Molekulargewicht von Pravastatin von 424,53 g/mol (Quelle: <http://www.chemie.fu-berlin.de/cgi-bin/molform>, Quelle für die chemische Formel: Blum, 1994) auf ein Ergebnis von ca.  $7 \times 10^{-5}$  mol/l. Da „allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist“ (Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, genannt Paracelsus), liegt es nahe, dass hier die therapeutische Breite der HMGCoA-Reduktasehemmer überschritten und toxische Bereiche erreicht wurde(n). Die von anderen Arbeitsgruppen zum Teil auch bei anderen Zelltypen – wie z.B. aus Koronarien gewonnen Zellen oder bei intakten Gefäßstücken – eingesetzten Dosierungen lagen meist – wie auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Atorvastatin-Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l – um Zehnerpotenzen unter diesen Apoptose-auslösenden Konzentrationen (Oi et al., 1999; Shiga et al., 2005; Luo et al., 2001; Hu et al., 2006; Kozai et al., 2005; Ito et al., 2004; Jaschke et al., 2005; Morikawa-Futamatsu et al., 2006).

## 5. Zusammenfassung

Den Cholesterin-unabhängigen Effekten der HMGCoA-Reduktasehemmer wird nachgesagt, die Entwicklung einer Myokardhypertrophie und kardialen Dysfunktion zu verhindern. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob durch eine Behandlung mit Atorvastatin die Ausbildung einer hypertrophen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz an einem transgenen Rattenmodell mit einer Aktivierung des gewebeständigen Renin-Angiotensin-Systems durch Überexprimierung des Mäuserenings (TG(mREN2)27) verhindert werden kann.

Die unbehandelten Renin-transgenen Ratten wiesen ein vermindertes Wachstum auf und entwickelten eine linksventrikuläre Hypertrophie, die von einer Fibrose und einer kontraktilen Dysfunktion begleitet wurde. Durch eine Therapie mit Atorvastatin von der sechsten bis zur zwölften Lebenswoche wurden die Myokardhypertrophie und die Entwicklung einer diastolischen kontraktilen Dysfunktion vermindert. Eine mögliche Ursache war eine Abnahme der Myokardfibrose durch die Statin-Behandlung.

Um den den Umbauprozessen zugrundeliegenden Signaltransduktionsweg zu ermitteln, wurde die Expressierung und Aktivierung der MAP-Kinasen im Myokard untersucht. Bei den unbehandelten transgenen Ratten waren die MAP-Kinasen p44/42 und p38 vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert. Die Behandlung mit Atorvastatin verminderte deren Aktivierung.

Die molekularen Mechanismen wurden zusätzlich an isolierten Herzmuskelzellen untersucht. Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) führt zu einer Herzmuskelzellhypertrophie. Interessanterweise zeigte sich, dass nur eine durch TNF $\alpha$  ausgelöste Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p44/42 durch Atorvastatin verhindert wurde. Eine durch Ang II hervorgerufene Aktivierung blieb durch den HMGCoA-Reduktasehemmer unbeeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Statine eine durch Hypertonie induzierte Myokardhypertrophie und Dysfunktion vermindern. Möglicherweise ist ein entscheidender Mechanismus die Hemmung der MAP-Kinasen-Signaltransduktion.

## 6. Summary

Pleiotropic effects of HMGCoA-reductase inhibitors have been suggested to prevent cardiac hypertrophy and dysfunction. Aim of the present study was to examine whether treatment with atorvastatin may prevent the development of hypertensive cardiomyopathy and heart failure in a transgenic rat model mimicking the overactivation of the tissue renin-angiotensin system.

Rats overexpressing the mouse renin gene (TG(mREN2)27) present with a decreased growth and developed a left ventricular hypertrophy, accompanied by cardiac fibrosis and contractile dysfunction. Treatment of (TG(mREN2)27) with atorvastatin from week 6 to 12 of life prevented the myocardial hypertrophy and the development of a diastolic contractile dysfunction. One possible explanation for this beneficial effect of atorvastatin was the prevention of the myocardial fibrosis by statin treatment.

In order to exam the signal transduction pathways involved in the development of myocardial remodelling and being altered by statin treatment MAP kinase expression and activation was examined in rat myocardium. (TG(mREN2)27) presented with increased phosphorylation and thus activation of MAP-kinases p44/42 and p38 compared to littermate controls. Treatment with atorvastatin reduced this MAP kinase activation.

The molecular mechanisms were additionally investigated in isolated rat cardiac myocytes. The stimulation with angiotensin II (Ang II) or tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) leads to a hypertrophy of cardiomyocytes. Interestingly, only activation of the MAP-kinases p44/42 and p38 induced by TNF $\alpha$  was prevented by atorvastatin. Ang II stimulated MAP kinase activation remained unaffected by the HMGCoA-reductase inhibitor.

In conclusion, results of this study show that statin treatment prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in a renin induced hypertensive cardiomyopathy. A crucial mechanism involved in these beneficial effects might be inhibition of MAP-kinase signalling.

## 7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	Angiotensinkonversionsenzym
AG	Aktiengesellschaft
Ang.	Angiotensin II
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
At.	Atorvastatin
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensinrezeptor Subtyp 1
AT <sub>2</sub> -Rezeptor	Angiotensinrezeptor Subtyp 2
AV-Knoten	atrioventrikulärer Knoten
bidest.	doppelt destilliert
BMK	big mitogen-activated kinase
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOCA	Deoxykortikosteron-Azetat
+dp/dt	Kontraktionsgeschwindigkeit
-dp/dt	Relaxationsgeschwindigkeit
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Bis-Aminoethyl-Glykoether-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm

ERK	extrazellulär responsive Kinase
ESP	endsystolischer Druck
et al.	et alii, und andere
FS	fractional shortening
G	Gauge
g	Gramm
20000 g	20000 * Erdgeschwindigkeit
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HDL	high density lipoprotein
HMGCoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hsp25/27	Hitzeschock-Protein 25/27
IL	Interleukin
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
LV	linksventrikulär
LVAD	left ventrikular assist device
LVDP	left ventrikular developed pressure
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEDWD	linksventrikuläre enddiastolische Wanddicke
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVESP	linksventrikulärer endsystolischer Druck
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen

LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK	MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2C	myocyte enhancement factor 2C
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
Mnk1	MAP kinase signal-integrating kinase 1
Mnk2	MAP kinase signal-integrating kinase 2
mRNA	messenger ribonuclein acid, Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase
N	normal
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NF	nuclear factor
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxyd
p	Konfidenzniveau
PBS	phosphat buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PRAK	p38-related/activated protein kinase
RAS	Renin-Angiotensin-System
resp.	respektive
RRsys	systolischer Blutdruck
RV	rechtsventrikulär
s	Sekunde
SD	Sprague-Dawley, Sprague-Dawley-Ratten
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Sek.	sekundär
SEM	standard error of measurement
SERCA	Sarko(endo)plasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase
s.o.	siehe oben
SOCS-1	suppressor of cytokine signalling-1
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT	signal transducers and activators of transcription
SV	Schlagvolumen
TBS	tris buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	transgen, Renin-transgene Ratten
TG-A	Renin-transgene, mit Atorvastatin behandelte Ratten
TGF	tumor growth factor
TG(mREN2)27	Ratten mit Überexprimierung des Mäusereningsens
TNF	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF-RI	Tumornekrosefaktor-Rezeptor I
TNF-RII	Tumornekrosefaktor-Rezeptor II
U	Units, Einheiten
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
Vol	Volumen
vs.	versus

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Abraham,S.S., Osorio,J.C., Homma,S., Wang,J., Thaker,H.M., Liao,J.K. und Mital,S. Simvastatin preserves cardiac function in genetically determined cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 43 (454):461, 2004.
- 2 Amberger,C., Glardon,O. Glaus,T., Hörauf,A., King,J.N., Schmidli,H., Schröter,L. und Lombard,C.W. Effects of benazepril in the treatment of feline hypertrophic cardiomyopathy. Results of a prospective, open-label, multicenter clinical trial. *J Vet Cardiol* 1 (1):19-26, 1999.
- 3 Angermann,C.E. und Nitschmann,S. Statintherapie bei Herzinsuffizienz. *Internist (Berl)* 49 (7):884-886, 2008.
- 4 Aoyagi,T., Nakamura,F., Tomaru,T. und Toyo-Oka,T. Beneficial effects of pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor; on cardiac function in ischemic and nonischemic heart failure. *Int Heart J* 49 (1):49-58, 2008.
- 5 Arai,M., Matsui,H. und Periasamy,M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74 (4):555-564, 1994.
- 6 Bachmann,S., Peters,J., Engler,E., Ganten,D. und Mullins,J. Transgenic rats carrying the mouse renin gene: morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 41:24-36, 1992.
- 7 Baker,K.M., Chernin,M.I., Wixson,S.K. und Aceto,J.F. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 259 (2):H324-H332, 1990.
- 8 Bauersachs,J., Störk,S., Kung,M., Walla,C., Fidler,F., Hoya,C., Frantz,S., Weidemann,F., Ertl,G. und Angermann,C.E. HMG CoA reductase inhibition and left ventricular mass in hypertrophic cardiomyopathy: a randomized placebo-controlled pilot study. *Eur J Clin Invest* 37 (11):852-859, 2007.



- 9 Behr,T.M., Nerurkar,S.S., Nelson,A.H., Coatney,R.W., Woods,T.N., Sulpizio,A., Chandra,S., Brooks,D.P., Kumar,S., Lee,J.C., Ohlstein,E.H., Angermann,C.E., Adams,J.L., Sisko,J., Sackner-Bernstein,J.D. und Willette,R.N. Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation* 104 (11):1292-1298, 2001.
- 10 Blum,C.B. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol* 73:3D-11D, 1994.
- 11 Böhm,M., Moll,M., Schmid,B., Paul,M., Ganten,D., Castellano,M. und Erdmann,E. Beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. *Hypertension* 24 (6):653-662, 1994.
- 12 Bogoyevitch,M.A., Gillespie-Brown,J., Kettermann,A.J., Fuller,S.J., Ben Levy,R., Ashworth,A., Marshall,C.J. und Sugden,P.H. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79 (2):162-173, 1996.
- 13 Bogoyevitch,M.A., Kettermann,A.J. und Sugden, P.H. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270 (50):29710-29717, 1995.
- 14 Booz,G.W. und Baker,K.M. Role of Type 1 and Type 2 Angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 28 (4):635-640, 1996.
- 15 Brown,J.H., Del Re,D.P. und Sussman,M.A. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 98 (6):730-742, 2006.

- 16 Brown,M.S. und Goldstein,J.L. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res.* 21 (5):505-517, 1980.
- 17 Bueno,O.F. und Molkenin,J.D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 91 (9):776-781, 2002.
- 18 Carafoli,E. The homeostasis of calcium in heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 17 (3):203-212, 1985.
- 19 Carre,F., Rannou,F., Sainte Beuve,C., Chevalier,B., Moalic,J.M., Swynghedauw,B. und Charlemagne,D. Arrhythmogenicity of the hypertrophied and senescent heart and relationship to membrane proteins involved in the altered calcium handling. *Cardiovasc Res* 27 (10):1784-1789, 1993.
- 20 Chetboul,V., Lefebvre,H.P., Pinhas,C., Clerc,B., Boussouf,M. und Pouchelon,J.L. Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *J Vet Intern Med* 17:89-95, 2003.
- 21 Cigola,E., Kajastura,J., Li,B., eggs,L.G. und Anversa,P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 231 (2):363-371, 1997.
- 22 Cirrincione,G.M., Boluyt,M.O., Hwang,H.S. und Bleske,B.E. 3-HMG-Coenzyme A reductase inhibition and extracellular matrix gene expression in the pressure-overloaded rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 (4):521-530, 2006.
- 23 Clerk,A., Fuller,S.J., Michael,A. und Sugden,P.H. Stimulation of "Stress-regulated" Mitogen-activated Protein Kinases (Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases and p38-Mitogen-activated Protein Kinases) in Perfused Rat Hearts by Oxidative and Other Stresses. *J Biol Chem* 273 (13):7228-7234, 1998.

- 24 Clerk,A. und Sugden,P.H. Small Guanine Nucleotide-Binding Proteins and Myocardial Hypertrophy. *Circ Res* 86 (10):1019-1023, 2000.
- 25 Clerk,A. und Sugden,P.H. Signaling through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in cardiac myocytes. *Biochem Cell Biol* 82 (6):603-609, 2004.
- 26 Cook,S.A., Sugden,P.H. und Clerk,A. Activation of c-JUN N-terminal kinas and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31 (8):1429-1434, 1999.
- 27 Cooper,G. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Ann Rev Physiol* 49:501-518, 1987.
- 28 Dahlöf,B. Effekt of angiotensin II blockade on cardiac hypertrophy and remodeling: a review. *J Hum Hypertens* 9 Suppl 5:S37-S44, 1995.
- 29 Danser,A.H., van Kats,J.P., Admiraal,P.J., Derkx,F.H., Lamers,J.M., Verdouw,P.D., Saxena,P.R. und Schalekamp,M.A. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24 (1):37-48, 1994.
- 30 Danser,A.H.J., van Kesteren,C.A.M., Bax,W.A., Tavenier,M., Derkx,F.H.M., Saxena,P.R. und Schalekamp,M.A.D.H. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts: evidence for renin binding. *Circulation* 96 (1):220-226, 1997.
- 31 Das,M., Das,S. und Das,D.K. Caveolin and MAP kinase interaction in angiotensin II preconditioning of the myocardium. *J Cell Mol Med* 11 (4):788-797, 2007.
- 32 Davignon,J., Jacob,R.F. und Mason,R.P. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 15:251-258, 2004.

- 33 Deak,M., Clifton,A.D., Lucocq,L.M. und Alessi,D.R. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17 (15):4426-4441, 1998.
- 34 de Boer,R., Pokharel,S., Flesch,M., van Kampen,D.A., Suurmeijer,A.J.H., Boomsma,F., van Gilst,W.H., van Veldhuisen,D.J. und Pinto,Y.M. Extracellular signal regulated kinase and SMAD signaling both mediate the angiotensin II driven progression towards overt heart failure in homozygous TGR(mRen2)27. *J Mol Med* 82:678-687, 2004.
- 35 Dechend,R., Fiebeler,A., Lindschau,C., Bischoff,H., Park,J.K., Dietz,R., Haller,H. und C. Luft F.C. Modulating angiotensin II-induced inflammation by HMG Co-A reductase inhibition. *Am J Hypertens* 14 (6 Pt 2):55S-61S, 2001. a
- 36 Dechend,R., Fiebeler,A., Park,J.K., Muller,D.N. Theuer,J., Mervaala,E., Bieringer,M., Gulba,D., Dietz,R., Luft,F.C. und Haller,H. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Circulation* 104 (5):576-581, 2001. b
- 37 Decker,T. und Kovarik,P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19 (21):2628-2637, 2000.
- 38 Demyanets,S., Kaun,C., Paffenberger,S., Hohensinner,P.J., Rega,G., Pammer,J., Maurer,G., Huber,K. und Wojta,J. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 71:1324-1330, 2006.
- 39 Deslypere,J.P. Clinical implications of the biopharmaceutical properties of fluvastatin. *Am J Cardiol* 73:12D-17D, 1994.
- 40 Di Napoli,P., Antonio,A., Di Gioacchino,L., De Caterina,R. und Barsotti,A. Regulation of endothelial function in coronary microcirculation by HMG-CoA reductase drugs. *Ital Heart J* 3 (Suppl 4):20S-23S, 2002.

- 41 Dhingra,S., Shama,A.K., Singla,D.K. und Singal,P.K. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (6):H3524-H3531, 2007.
- 42 El-Ani,D. und Zimlichman,R. Simvastatin induces apoptosis of cultured rat cardiomyocytes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 12 (4):325-338, 2001.
- 43 Fabiato,A. und Fabiato,F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249 (3):469-495, 1975.
- 44 Flesch,M., Schwinger,R.H., Schnabel,P., Schiffer,F., van Gelder,I., Bavendiek,U., Südkamp,M., Kuhn-Regnier,F. und Böhm,M. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 74 (6):321-332, 1996.
- 45 Flesch,M., Schiffer,F., Zolk,O., Pinto,Y., Rosenkranz,S., Hirth-Dietrich,C., Arnold,G., Paul,M. und Böhm,M. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 30 (3):383-391, 1997. a
- 46 Flesch,M., Schiffer,F., Zolk,O., Pinto,Y., Stasch,J.P., Knorr,A., Ettlbrück,S. und Böhm,M. Angiotensin receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition improve diastolic dysfunction and Ca<sup>2+</sup>-ATPase expression in the sarcoplasmic reticulum in hypertensive cardiomyopathy. *J Hypertens* 15 (9):1001-1009, 1997. b
- 47 Flesch,M., Margulies,K.B., Mochmann,H.C., Engel,D., Sivasubramanian,N. und Mann,D.L. Differential regulation of mitogene-activated protein kinases in the failing human heart in response to mechanical loading. *Circulation* 104:2273-2276, 2001.

- 48 Flesch,M., Hoper,A., Dell'Italia,L., Evans,K., Bond,R., Peshock,R., Diwan,A., Brinsa,T.A., Wei,C.C., Sivasubramanian,N., Spinale,F.G. und Mann,D.L. Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 108 (5):598-604, 2003.
- 49 Fox,P.R. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical and pathologic correlates. *J Vet Cardiol* 5 (2):39-45, 2003.
- 50 Gao,L., Wang,W., Li,Y.L., Schultz,H.D., Liu,D., Cornish,K.G. und Zucker,I.H. Simvastatin therapy normalizes sympathetic neural control in experimental heart failure: roles of angiotensin II type 1 receptors and NAD(P)H oxidase. *Circulation* 112 (12):1763-1770, 2005.
- 51 Goosen,T.C., Bauman,J.N., Davis,J.A., Yu,C., Hurst,S.I., Williams,J.A. und Loi,C.M. Atorvastatin glucuronidation is minimally and nonselectively inhibited by the fibrates gemfibrozil, fenofibrate, and fenofibric acid. *Drug Metab Dispos* 35 (8):1315-1324, 2007.
- 52 Grundy,S.M. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation* 97 (15):1436-1439, 1998.
- 53 Habibi,J., Whaley-Connell,A., Qazi,M.A., Hayden,M.R., Cooper,S.A., Tramontano,A., Thyfault,J., Stump,C., Ferrario,C., Muniyappa,R. und Sowers,J.R. Rosuvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, decreases cardiac oxidative stress and remodeling in ren2 transgenic rats. *Endocrinology* 148 (5):2181-2188, 2007.
- 54 Haq,S., Choukroun,G., Lim,H., Tymitz,K.M., del Monte,F., Gwathmey,J., Grazette,L., Michael,A., Hajjar,R., Force,T. und Molkentin,J.D. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103 (5):670-677, 2001.

- 55 Hasegawa,H., Yamamoto,R., Takano,H., Mizukami,M., Asakawa,M., Nagai,T. und Komuro,I. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol* 35:953-960, 2003.
- 56 Hayashida,W., Kihara,Y., Yasaka,A., Inagaki,K., Iwanaga,Y. und Sasayama,S. Stage-specific differential activation of mitogen-activated protein kinases in hypertrophied and failing rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 33:733-744, 2001.
- 57 He,Y.P., Zhao,L.Y., Zheng,Q.S., Liu,S.W., Zhao,X.Y., Lu,X.L., Niu,X.L. und Li,X. Involvement of ERK and AKT signaling in the growth effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast and the modulation by simvastatin. *Mol Cell Biochem* 317:33-41, 2008.
- 58 Henwood,J.M. und Heel,R.C. Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 36 (4):429-454, 1988.
- 59 Hill,R.J., Dabbagh,K., Phippard,D., Li,C., Suttman,R.T., Welch,M., Papp,E., Song,K.W., Chang,K.C., Leaffer,D., Kim,T.N., Roberts,R.T., Zabka,T.S., Aud,D., DalPorto,J., Manning,A.M., Peng,S.L., Goldstein,D.M. und Wong,B.R. Pamapimod, A novel p38 MAP kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 327 (3):610-619, 2008.
- 60 Ho,K.K., Anderson,K.M., Kannel,W.B., Grossman,W. und Levy,D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88 (1):107-115, 1993.
- 61 Ho,T.C., Chen,S.L., Yang,Y.C., Chen,C.Y., Feng,F.P., Hsieh,J.W., Cheng,H.C. und Tsao,Y.P. 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin j2 induces vascular endothelial cell apoptosis through the sequential activation of mapks and p53. *J Biol Chem* 283 (44):30273-30288, 2008.

- 62 Hu,T.P., Xu,F.P., Li,Y.J. und Luo, J.D. Simvastatin inhibits leptin-induced hypertrophy in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Acta Pharmacol Sin* 27 (4):419-422, 2006.
- 63 Inesi,G., Sumbilla,C. und Kirtley,M.E. Relationships of molecular structure and function in Ca<sup>2</sup>(+)-transport ATPase. *Physiol Rev* 70 (3):749-760, 1990.
- 64 Ikeda,M., Sasaguri,M., Maruta,H. und Arakawa,K. Formation of angiotensin II by tonin-inhibitor complex. *Hypertension* 11 (1):63-70, 1988.
- 65 Isbell,D.C., Voros,S., Yang,Z., DiMaria,J.M., Berr,S.S., French,B.A., Epstein,F.H., Bishop,S.P., Wang,H., Roy,R.J., Kemp,B.A., Matsubara,H., Carey,R.M. und Kramer,C.M. Interaction between bradykinin subtype 2 and angiotensin II type 2 receptors during post-MI left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (6):H3372-H3378, 2007.
- 66 Ito,M., Adachi,T., Pimentel,D.R., Ido,Y. und Colucci,W.S. Statins inhibit {beta}-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes via a Rac1-dependent mechanism. *Circulation* 110 (4):412-418, 2004.
- 67 Jaschke,B., Michaelis,C., Milz,S., Voseger,M., Mund,T., Hengst,L. Kastrati,A., Schömig,A. und Wessely,R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res* 68:483-492, 2005.
- 68 Jones,S.P., Gibson,M.F., Rimmer,D.M.III, Gibson,T.M., Sharp,B.R. und Lefer,D.J. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 40 (6):1172-1178, 2002.
- 69 Kacimi,R. und Gerdes,A.M. Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure. *Hypertension* 41:968-977, 2003.



- 70 Kajastura,J., Cigola,E., Malhorta,A., Li,P., Cheng,W., Meggs,L.G. und Anversa,P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 29 (3):859-870, 1997.
- 71 Kalra,D., Sivasubramanian,N. und Mann,D.L. Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation* 105 (18):2198-2205, 2002.
- 72 Kaneta,S., Satoh,K., Kano,S., Kanda,M. und Ichihara,K. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 170:237-243, 2003.
- 73 Kang,L., Ge, C.J.und Hu,S.J. Beneficial effect of atorvastatin on left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 80 (2-3):120-126, 2007. a
- 74 Kang,L. Fang,Q. und Hu,S.J. Regulation of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase by atorvastatin: implication for cardiac hypertrophy. *Arch Pharm Res* 30 (5):596-602, 2007. b
- 75 Kannel,W.B., Ho,K. und Thom,T. Changing eppidemiological features of cardiac failure. *Br Heart J* 72 (Supplement):S3-S9, 1994.
- 76 Katwa,L.C., Campbell,S.E., Tyagi,S.C., Lee,S.J., Cicila,G.T. und Weber,K.T. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *J Mol Cell Cardiol* 29 (5):1375-1386, 1997.
- 77 Katz,S.A., Opsahl,J.A., Lunzer,M.M., Forbis,L.M. und Hirsch,A.T. Effect of bilateral nephrectomy on active renin, angiotensinogen, and renin glycoforms in plasma and myocardium. *Hypertension* 30 (2):259-266, 1997.
- 78 Kirchberger,M.A., Tada,M. und Katz,A.M. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its

relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249 (19):6166-6173, 1974.

- 79 Kjekshus,J., Apetrei,E., Barrios,V., Böhm,M., Cleland,J.G.F., Cornel,J.H., Dunselman,P., Fonseca,C., Goudev,A., Grande,P., Gullestad,L., Hjalmarson,A., Hradec,J., Jánosi,A., Kamenský,G., Komajda,M., Korewicki,J., Kuusi,T., Mach,F., Maarev,V., McMurray,J.J.V., Ranjith,N., Schaufelberger,M., Vanhaecke,J., van Veldhuisen,D.J., Waagstein,F., Wedel,H. und Wikstrand,J. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *N Engl J Med* 357 (22):2248-2261, 2007.
- 80 Klickstein,L.B., Kaempfer,C.E. und Wintroub,B.U. The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem* 257 (24):15042-15046, 1982.
- 81 Kojima,M., Shiojima,I., Yamazaki,Y., Komuro,I., Zou,Z., Wang,Y., Mizuno,T., Ueki,K., Tobe,K. und Kadowaki,T. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation* 89 (5):2204-2211, 1994.
- 82 Kong,J.Y. und Rabkin,S.W. Lovastatin does not accentuate but is rather additive to palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67:293-302, 2002. (Abstract)
- 83 Kozai,T., Eto,M., Yang,Z., Shimokawa,H. und Luscher,T.F. Statins prevent pulsatile stretch-induced proliferation of human saphenous vein smooth muscle cells via inhibition of Rho/Rho-kinase pathway. *Cardiovasc Res* 68 (3):475-482, 2005.
- 84 Krum,H., Ashton,E., Reid,C., Kalff,V., Rogers,J., Amarena,J., Singh,B. und Tonkin,A. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of high-dose HMG CoA reductase inhibitor therapy on ventricular remodeling, pro-

inflammatory cytokines and neurohormonal parameters in patients with chronic systolic heart failure. *J Card Fail* 13 (1):1-7, 2007.

- 85 Kudoh,S., Komuro,I., Hiroi,Y., Zou,Y., Harada,K., Sugaya,T., Takekoshi,N., Murakami,K., Kadowaki,T. und Yazaki,Y. Mechanical stretch induces hypertrophic responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *J Biol Chem* 273 (37):24037-24043, 1998.
- 86 Kyriakis,J.M. und Avruch,J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81 (2):807-869, 2001.
- 87 Laufs,U., La Fata,V. und Liao,J.K. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272 (50):31725-31729, 1997.
- 88 Laufs,U., La Fata,V., Plutzky,J. und Liao,J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97 (12):1129-1135, 1998.
- 89 Laufs,U., Marra,D., Node,K. und Liao,J.K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho GTPase-induced down-regulation of p27Kip1. *J Biol Chem* 274 (31):21926-21931, 1999.
- 90 Lee,T.M., Lin,M.S., Chou,T.F., Tsai,C.H. und Chang,N.C. Effect of pravastatin on development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H220-H227, 2005.
- 91 Lee,T.M., Lin,M.S., Tsai,C.H. und Chang,N.C. Effect of pravastatin on left ventricular mass in the two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2705-H2713, 2006.a

- 92 Lee,T.M, Lin,M.S., Chou,T.F. und Chang,N.C. Additive effects of combined blockade of AT1 receptor and HMG-CoA reductase on left ventricular remodeling in infarcted rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (3):H1281-H1289, 2006.b
- 93 Lefloch,R., Pouyssegur,J. und Lenormand,P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 28 (1):511-527, 2008.
- 94 Levy,D., Larson,M.G., Vasan,R.S., Kannel,W.B. und Ho,K.K. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275 (20):1557-1562, 1996.
- 95 Li,X., Liu,L., Tupper,J.C., Bannerman,D.D., Winn,R.K., Sebt,S.M., Hamilton,A.D. und Harlan,J.M. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 277 (18):15309-15316, 2002.
- 96 Liao,J.K. und Laufs,U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005:89-118, 2005.
- 97 Liao,Y., Zhao,H., Ogai,A., Kato,H., Asakura,M., Kim,J., Asanuma,H., Minamino,T., Takashima,S. und Kitakaze,M. Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. *Hypertens Res* 31:335-344, 2008.
- 98 Liu,J., Shen,Q. und Wu,Y. Simvastatin prevents cardiac hypertrophy in vitro and in vivo via JAK/STAT pathway. *Life Sci* 82 (19-20):991-996, 2008.
- 99 Loch,D., Levick,S., Hoey,A. und Brown,L. Rosuvastatin attenuates hypertension-induced cardiovascular remodeling without affecting blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 (3):396-404, 2006.

- 100 Luo,J.D., Zhang,W.W., Zhang,G.P., Guan,J.X. und Chen,X. Simvastatin inhibits cardiac hypertrophy and angiotensin-converting enzyme activity in rats with aortic stenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (11):903-908, 1999.
- 101 Luo,J.D., Xie,F., Zhang,W.W., Ma,X.D., Guan,J.X. und Chen,X. Simvastatin inhibits noradrenaline-induced hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 132:159-164, 2001.
- 102 Luo,J.D., Zhang,W.W., Zhang,G.P., Zhong,B.H. und Ou,H.J. Effects of simvastatin on activities of endogenous antioxidant enzymes and angiotensin-converting enzyme in rat myocardium with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Acta Pharmacol Sin* 23 (2):124-128, 2002.
- 103 Maron,D.J., Fazio,S. und Linton,M.F. Current perspectives on statins. *Circulation* 101 (2):207-213, 2000.
- 104 Mattiazzi,A., Mundina-Weilenmann,C., Guoxiang,C., Vittone,L. und Kranias,E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 68:366-375, 2005.
- 105 McEwan,P.E., Gray,G.A., Sherry,L., Webb,D.J. und Kenyon,C.J. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 98 (24):2765-2773, 1998.
- 106 Mital,S. und Liao,J.K. Statins and the myocardium. *Semin Vasc Med* 4 (4):377-384, 2004.
- 107 Mitsunami,K., Inoue,S., Maeda,K., Endoh,S., Takahashi,M., Okada,M., Sugihara,H. und Kinoshita,M. Three-month effects of candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist, on left ventricular mass and hemodynamics in patients with essential hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther* 12 (5):469-474, 1998.

- 108 Moiseeva,O.M., Semyonova,E.G., Polevaya,E.V. und Pinayev,G.P. Effect of pravastatin on phenotypical transformation of fibroblasts and hypertrophy of cardiomyocytes in culture. *Bull Exp Biol Med* 143 (1):54-57, 2007.
- 109 Mondry,A. und Swynghedauw,B. Biological adaptation of the myocardium to chronic mechanical overload. Molecular determinants of the autonomic nervous system. *Eur Heart J* 16 Suppl I:64-73, 1995.
- 110 Moriguchi,A., Brosnihan,K.B., Kumagai,H., Ganten,D. und Ferrario,C.M. Mechanisms of hypertension in transgenic rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266 (4):R1273-R1279, 1994.
- 111 Morikawa-Futamatsu,K., Adachi,S., Maejima,Y., Tamamori-Adachi,M., Suzuki,J., Kitajima,S., Ito,H. und Isobe,M. HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via Rho kinase and inhibition of cyclin D1. *Life Sci* 79:1380-1390, 2006.
- 112 Mullins,J.J., Peters,J. und Ganten,D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2-gene. *Nature* 344(6266):541-544, 1990.
- 113 Murphy,L.O., Smith,S., Chen,R.H., Fingar,D.C. und Blenis,J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4 (8):556-564, 2002.
- 114 Nakajima,K., Suga,H., Matsuno,H., Ishisaki,A., Hirade,K. und Kozawa,O. Differential roles of MAP kinases in atorvastatin-induced VEGF release in cardiac myocytes. *Life Sci* 79:1214-1220, 2006.
- 115 Ni,W., Egashira,K., Kataoka,C., Kitamoto,S., Koyanagi,M., Inoue,S. und Takeshita,A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitors in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circ Res* 89 (5):415-421, 2001.

- 116 Nickenig,G., Laufs,U., Schnabel,P., Knorr,A., Paul,M. und Böhm,M. Down-regulation of aortic and cardiac AT<sub>1</sub>-receptor gene expression in transgenic (mRen-2) 27 rats. *Br J Pharmacol* 121:134-140, 1997.
- 117 Nishimura,M., Tanaka,T., Yasuda,T., Kurakata,S., Kitagawa,M., Yamada,K., Saito,Y. und Hirai,O. Effect of pravastatin on type IV collagen secretion and mesangial cell proliferation. *Kidney Int Suppl* 71:S97-S100, 1999.
- 118 Ogata,Y., Takahashi,M., Takeuchi,K., Ueno,S., Mano,H., Ookawara,S., Kobayashi,E., Ikeda,U. und Shimada,K. Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: A possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:907-915, 2002.
- 119 Oi,S., Haneda,T., Osaki,J., Kashiwagi,Y., Nakamura,Y., Kawabe,J. und Kikuchi,K. Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol* 376:139-148, 1999.
- 120 Ong,H.T. Protecting the heart: a practical review of the statin studies. *MedGenMed* 4 (4):1, 2002.
- 121 Ono,K. und Han,J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12 (1):1-13, 2000.
- 122 Osorio, J.C., Cheema,F.H., Martens,T.P., Mahmut,N., Kinnear,C., Gonzalez,A.M., Bonney,W., Homma,S., Liao,J.K. und Mital,S. Simvastatin reverses cardiac hypertrophy caused by disruption of the bradykinin 2 receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 86 (9):633-642, 2008.
- 123 Ouwens,D.M., de Ruiter,N.D., van der Zon,G.C., Carter,A.P., Schouten,J., van der Burgt,C., Kooistra,K., Bos,J.L., Maassen,J.A. und van Dam,H. Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J.* 21:3782-3793, 2002.

- 124 Pacifico,A. und Henry,P.D. Structural pathways and prevention of heart failure and sudden death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14 (7):764-775, 2003.
- 125 Page,I.H., Helmer,O.M., Plentl,A.A., Kohlstaedt,K.G. und Corcoran,A.C. Suggested change in designation of "renin-activator" (hypertensinogen) to renin-substrate (agr globulin). *Science* 98 (2537):153-154, 1943.
- 126 Pan,H.Y., DeVault,A.R., Swites,B.J., Whigan,D., Ivashkiv,E., Willard,D.A. und Brescia,D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin alone and with cholestyramine in hypercholesterolemia. *Clin Pharmacol Ther* 48:201-207, 1990.
- 127 Park,J.K., Müller,D.N., Mervaala,E.M.A., Dechend,R., Fiebeler,A., Schmidt,F., Bieringer,M., Schäfer,O., Lindschau,C., Schneider,W., Ganten,D., Luft,F.C. und Haller,H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 58 (4):1420-1430, 2000.
- 128 Patel,R., Nagueh,S.F., Tsybouleva,N., Abdellatif,M., Lutucuta,S., Kopelen,H.A., Quinones,M.A., Zoghbi,W.A., Entman,M.L., Roberts,R. und Marian,A.J. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 104 (3):317-324, 2001.
- 129 Paul,M., Pinto,Y., Schunkert,H., Ganten,D. und Böhm,M. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure and hypertrophy - studies in human hearts and transgenic rats. *Eur Heart J* 15 (Supplement D):63-67, 1994.
- 130 Pearson,G., Robinson,F., Beers Gibson,T., Xu,B., Karandikar,M., Berman,K. und Cobb,M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22 (2):153-183, 2001.
- 131 Periasamy,M. und Kalyanasundaram,A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35 (4):430-442, 2007.



- 132 Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A und Frohlich, E.D. Validity of an indirect tail-cuff method of determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 78:957-962, 1971.
- 133 Ping, Y., Li, S., Chang, Z. und Yongxue, L. Atorvastatin attenuating down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in preventing cardiac hypertrophy of rats in vitro and in vivo. *J Pharm Pharmaceut Sci* 9 (3):365-375, 2006.
- 134 Planavila, A., Laguna, J.C. und Vázquez-Carrera, M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. *Biochim Biophys Acta* 1687:76-83, 2005.
- 135 Planavila, A., Rodríguez-Calvo, R., Palomer, X., Coll, T., Sánchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C. und Vázquez-Carrera, M. Atorvastatin inhibits GSK-3 $\beta$  phosphorylation by cardiac hypertrophic stimuli. *Biochim Biophys Acta* 1781 (1-2):26-35, 2008.
- 136 Prasad, A.M., Ma, H., Sumbilla, C., Lee, D.I., Klein, M.G. und Inesi, G. Phenylephrine hypertrophy, Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2), and Ca<sup>2+</sup> signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C2269-C2275, 2007.
- 137 Purcell, N.H., Wilkins, B.J., York, A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., Robbins, J. und Molkentin, J.D. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (35):14074-14079, 2007.
- 138 Qi, M., Shannon, T.R., Euler, D.E., Bers, D.M. und Samarel, A.M. Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 272(5 Pt 2):H2416-H2424, 1997.

- 139 Qi,X., Pohl,N.M., Loesch,M., Hou,S., Li,R., Qin,J.Z., Cuenda,A. und Chen,G. p38{alpha} antagonizes p38{gamma} activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem* 282 (43):31398-31408, 2007.
- 140 Rabkin,S.W. und Kong,J.Y. Lovastatin-induced cardiac toxicity involves both oncotic and apoptotic cell death with the apoptotic component blunted by both caspase-2 and caspase-3 inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol* 193:346-355, 2003. (Abstract)
- 141 Rabkin,S.W., Lodha,P. und Kong,J.Y. Reduction of protein synthesis and statin-induced cardiomyocyte cell death. *Cardiovasc Toxicol* 7 (1):1-9, 2007.
- 142 Rabkin,S.W. und Tsang,M.Y. Interaction of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin and nitric oxide in cardiomyocyte cell death. *Pharmacology* 82 (1):74-82, 2008.
- 143 Raeymaekers,L., Hofmann,F. und Casteels,R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 252 (1):269-273, 1988.
- 144 Richardson,K.E., Tannous,P., Berenji,K., Nolan,B., Bayless,K.J., Davis,G.E., Rothermel,B.A. und Hill,J.A. Guanosine triphosphatase activation occurs downstream of calcineurin in cardiac hypertrophy. *J Investig Med* 53 (8):414-424, 2005.
- 145 Ridker,P.M., Rifai,N., Pfeffer,M.A., Sacks,F. und Braunwald,E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 100 (3):230-235, 1999.
- 146 Ruwfof,C. und van der Laarse,A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47 (23):37, 2000.

- 147 Saito,Y., Fujioka,D., Kawabata,K., Kobayashi,T., Yano,T., Nakamura,T., Kodama,Y., Takano,H., Kitta,Y., Obata,J.E. und Kugiyama,K. Statin reverses reduction of adiponectin receptor expression in infarcted heart and in TNF-alpha-treated cardiomyocytes in association with improved glucose uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3490-H3497, 2007.
- 148 Saka,M., Obata,K., Ichihara,S., Cheng,X.W., Kimata,H., Nishizawa,T., Noda,A., Izawa,H., Nagata,K., Murohara,T. und Yokota,M. Pitavastatin improves cardiac function and survival in association with suppression of the myocardial endothelin system in a rat model of hypertensive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 (6):770-779, 2006. a
- 149 Saka,M., Obata,K., Ichihara,S., Cheng,X.W., Kimata,H., Noda,A., Izawa,H., Nagata,K. und Yokota,M. Attenuation of ventricular hypertrophy and fibrosis in rats by pitavastatin: potential role of the RhoA-extracellular signal-regulated kinase-serum response factor signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:1164-1171, 2006. b
- 150 Saurin,A.T., Martin,J.L., Heads,R.J., Foley,C., Mockridge,J.W., Wright,M.J., Wang,Y. und Marber,M.S. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J.* 14 (14):2237-2246, 2000.
- 151 Savage,D.D., Garrison,R.J., Kannel,W.B., Levy,D., Anderson,S.J., Stokes,J.3<sup>rd</sup>, Feinleib,M. und Castelli,W.P. The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: the Framingham Study. *Circulation* 75 (1 Pt 2):I26-I33, 1987.
- 152 Schellings,M.W.M., Baumann,M., van Leeuwen,R.E.W., Duisters,R.F.J.J., Janssen,S.H.P., Schroen,B., Peutz-Kootstra,C.J., Heymans,S. und Pinto,Y:M. Imatinib attenuates end-organ damage in hypertensive homozygous TGR(mRen2)27 Rats. *Hypertension* 47 (3):467-474, 2006.

- 153 Schmidt,A.G., Edes,I. und Kranias,E.G. Phospholamban: a promising therapeutic target in heart failure? *Cardiovasc Drugs Ther* 15 (5):387-396, 2002.
- 154 Schwinger,R.H.G., Böhm,M., Schmidt,U., Karczewski,P., Bavendiek,U., Flesch,M., Krause,E.G. und Erdmann,E. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92 (11):3220-3228, 1995.
- 155 Sekiguchi,K., Li,X., Coker,M., Flesch,M., Barger,P.M., Sivasubramanian,N. und Mann, D.L. Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 63:433-442, 2004.
- 156 Senthil,V., Chen,S.N., Tysbouleva,N., Halder,T., Nagueh,S.F., Willerson,J.T., Roberts,R. und Marian,A.J. Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 97:285-292, 2005.
- 157 Shannon,T.R., Chu,G., Kranias,E.G. und Bers,D.M. Phospholamban decreases the energetic efficiency of the sarcoplasmic reticulum Ca pump. *J Biol Chem* 276 (10):7195-7201, 2001.
- 158 Sheng,L., Ye,P. und Liu,Y.X. Atorvastatin upregulates the expression of PPAR alpha/gamma and inhibits the hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 33:1080-1084, 2005. (Abstract)
- 159 Shiga,N., Hirano,K., Hirano,M., Nishimura,J., Nawata,H. und Kanaide,H. Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circ Res* 96 (9):1014-1021, 2005.

- 160 Stas,S., Whaley-Connell,A., Habibi,J., Appesh,L., Hayden,M.R., Karuparthi,P.R., Qazi,M., Morris,E.M., Cooper,S.A., Link,C.D., Stump,C., Hay,M., Ferrario,C. und Sowers,J.R. Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. *Endocrinology* 148 (8):3773-3780, 2007.
- 161 Sugden,P.H.. Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Ann Med* 33:611-622, 2001.
- 162 Sugden,P.H. und Clerk,A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 83 (4):345-352, 1998.
- 163 Tada,M., Kirchberger,M.A., Repke,D.I. und Katz,A.M. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 249 (19):6174-6180, 1974.
- 164 Tada,M., Yamada,M., Kadoma,M., Inui,M und Ohmori,F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46 (2):73-95, 1982.
- 165 Takemoto,M., Node,K., Nakagami,H., Liao,Y., Grimm,M., Takemoto,Y., Kitakaze,M. und Liao,J.K. Statins as antioxdant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108 (10):1429-1437, 2001.
- 166 Thomas,W.G., Thekkumkara,T.J. und Baker,K.M. Cardiac effects of All. AT1A receptor signaling, desensitization, and internalization. *Adv Exp Med Biol* 396:59-69, 1996.
- 167 Todd,P.A. und Goa,K.L. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 40 (4):583-607, 1990.

- 168 Tsai,C.T., Wang,D.L., Chen,W.P., Hwang,J.J., Hsieh,C.S., Hsu,K.L., Tseng,C.D., Lai,L.P., Tseng,Y.Z., Chiang,F.T. und Lin,J.L. Angiotensin II increases expression of  $\alpha_1C$  subunit of L-type calcium channel through a reactive oxygen species and cAMP response element-binding protein-dependent pathway in HL-1 myocytes. *Circ Res* 100 (10):1476-1485, 2007.
- 169 Turner,N.A., Aley,P.K., Hall,K.T., Warburton,P., Galloway,S., Midgley,L., O'Regan,D.J., Wood,I.C., Ball,S.G. und Porter,K.E. Simvastatin inhibits TNF $\alpha$ -induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 43 (2):168-176, 2007. a
- 170 Turner,N.A., Mughal,R.S., Warburton,P., O'Regan,D.J., Ball,S.G. und Porter,K.E. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effectss of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 76 (1):81-90, 2007. b
- 171 Urata,H., Kinoshita,A., Misono,K.S., Bumpus,F.M. und Husain,A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II- forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265 (36):22348-22357, 1990.
- 172 Vanhatupa,S., Ungureanu,D., Paakkunainen,M. und Silvennoinen,O. MAPK-induced Ser727 phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem J* 409 (1):179-185, 2008.
- 173 Vaughan,C.J., Murphy,M.B. und Buckley,B.M. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348:1079-1082, 1996.
- 174 Wang,Y., Huang,S., Sah,V.P., Ross,J., Brown,J.H., Han,J. und Chien,K.R. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 273 (4):2161-2168, 1998.

- 175 Wassmann,S., Laufs,U., Baumer,A.T., Muller,K., Ahlbory,K., Linz,W., Itter,G., Rosen,R., Bohm,M. und Nickenig,G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37 (6):1450-1457, 2001.
- 176 Weir,M.R. und Dzau,V.J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 12 (12 Pt 3):205S-213S, 1999.
- 177 Whaley-Connell,A.T., Chowdhury,N.A., Hayden,M.R., Stump,C.S., Habibi,J.; Wiedmeyer,C.E., Gallagher,P.E., Tallant,E.A., Cooper,S.A., Link,C.D., Ferrario,C. und Sowers,J.R. Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: role of the renin-angiotensin system in the Ren2 transgenic rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 291 (6):F1308-F1314, 2006.
- 178 Wharton,J., Morgan,K., Rutherford,R.A., Catravas,J.D., Chester,A., Whitehead,B.F., Leval,M.R., Yacoub,M.H. und Polak,J.M. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 284 (1):323-336, 1998.
- 179 Wigle,E.D. Hypertrophic cardiomyopathy: a 1987 viewpoint. *Circulation* 75 (2):311-322, 1987.
- 180 Xu,Z., Okamoto,H., Akino,M., Onozuka,H., Matsui,Y und Tsutsui,H. Pravastatin attenuates left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in angiotensin II-induced hypertensive mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 51 (1):62-70, 2008.
- 181 Yamazaki,T., Komuro,I., Kudoh,S., Zou,Y., Shiojima,I., Mizuno,T., Takano,H., Hiroi,Y., Ueki,K., Tobe,K., Kadowaki,T., Nagai,R. und Yazaki,Y. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 77 (2):258-265, 1995.
- 182 Yamazaki,T., Komuro,I., Zou,Y., Kudoh,S., Shiojima,I., Hiroi,Y., Mizuno,T., Aikawa,R., Takano,H. und Yazaki,Y. Norepinephrine induces the raf-1

kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -Adrenoceptors. *Circulation* 95 (5):1260-1268, 1997.

- 183 Yamazaki,T., Komuro,I., Kudoh,S., Zou,Y., Shiojima,I., Hiroi,Y., Mizuno,T., Maemura,K., Kurihara,H., Aikawa,R., Takano,H. und Yazaki,Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271 (6):3221-3228, 1996.
- 184 Yan,L., Tang,Q., Shen,D., Peng,S., Zheng,Q., Guo,H., Jiang,M. und Deng,W. SOCS-1 inhibits TNF-alpha-induced cardiomyocyte apoptosis via ERK1/2 pathway activation. *Inflammation* 31 (3):180-188, 2008.
- 185 Yang,H.Y. Liu,J.C., Chen,Y.L., Chen,C.H., Lin,H., Lin,J.W., Chiu,W.T., Chen,J.J. und Cheng,T.H. Inhibitory effect of trilinolein on endothelin-1-induced c-fos gene expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372:160-167, 2005.
- 186 Yoon,S. und Seger,R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24 (1):21-44, 2006.
- 187 Zacà,V., Rastogi,S., Imai,M., Wang,M., Sharov,V.G., Jiang,A., Goldstein,S. und Sabbah,H.N. Chronic monotherapy with rosuvastatin prevents progressive left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50 (6):551-557, 2007.
- 188 Zarubin,T. und Jiahuai Han,J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15 (1):11-18, 2005.
- 189 Zechner,D., Craig,R., Hanford,D.S., McDonough,P.M., Sabbadini,R.A. und Glembotski,C.C. MKK6 activates myocardial cell NF-kappa B and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 273 (14):8232-8239, 1998.



- 190 Zhai,Y., Gao,X., Wu,Q., Peng,L., Lin,J. und Zou,Z. Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF- $\beta_1$ /Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 587:196-203, 2008.
- 191 Zheng,X. und Hu,S.H. Effects of simvastatin on cardiac performance and expression of sarcoplasmic reticular calcium regulatory proteins in rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 26 (6):696-704, 2005.
- 192 Zheng,X. und Hu,S.H. Effects of simvastatin on cardiohemodynamic responses to ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Heart Vessels* 21:116-123, 2006.
- 193 Zhou,M.S., Jaimes,E.A. und Raij,L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 44 (2):186-190, 2004.
- 194 Zobel,C., Brixius,K., Pietsch,M., Münch,G., Böck,B. und Schwinger,R.H. Unchanged sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, reduced Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and negative force-frequency relationship in transgenic rats overexpressing the mouse renin gene. *J Mol Med* 76 (7):533-544, 1998.
- 195 Zobel,C. und Schwinger,R.H.G. Myokardiale Hypertrophie, eine Vorstufe der Myokardinsuffizienz? Untersuchungen am Modell der transgenen, hypertensiven Ratte (TG(mREN2)27). *Herz, Kreislauf* 31 (4):153-160, 1999.
- 196 Zolk,O., Flesch,M., Schnabel,P., Teisman,A.C., Pinto,Y., van Gilst,W.H., Paul,M. und Böhm,M. Effects of quinapril, losartan and hydralazine on cardiac hypertrophy and  $\beta$ -adrenergic neuroeffector mechanisms in transgenic (mREN2)27 rats. *Br J Pharmacol* 123:405-412, 1998.

## 9. Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Andrea Link

## 10. Danksagung

Für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation, die Bereitstellung des Themas, seine Unterstützung, Geduld und Ermutigungen danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Markus Flesch.

Dem Direktor der Klinik III für Innere Medizin, Herrn Prof. Dr. Erdmann gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten.

Ganz besonders danke ich auch dem Direktor des Instituts für Experimentelle Medizin, Herrn Prof. Dr. Jürgen H. Fischer, für die Möglichkeit, in seinem Institut Räumlichkeiten und Geräte nutzen zu dürfen, und für viele gute Ratschläge, Ideen und Ermutigungen.

Für praktische Unterstützung danke ich Dr. Roman Pfister, Dr. Mark Schellings, Dr. Stephane Heymans, Dr. Benedikt Rückriem und Dr. Andreas Knorr.

Prof. Dr. Stefan Dhein und Frau Anja Sagner, Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter, Prof. Dr. Robert H. G. Schwinger und seiner damaligen technischen Assistentin Frau Esra Saygili und nicht zuletzt Frau Iris Wisser danke ich für Hilfestellungen rund um die Zellkultur.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn „Conny“ Spelten, Frau Manuela Lerwe, Frau Ingrid Greiwe, Herrn Johann van de Burgwall, Frau Chris Raab und Andrea, deren Nachnamen ich leider nicht kenne, Frau Petra Heidt, Frau Andrea Ehlers und Dr. Xavier Doss für Hilfeleistungen verschiedenster Art bedanken.

Für die Hilfe bei computertechnischen Problemen, sowie für sprachliche und formelle Hinweise bei der Durchsicht meines Manuskripts danke ich Herrn Dr. rer. nat. Johannes Sander und Herrn Diplom-Handelslehrer Holger Scheel.

Mein weiterer Dank geht an meinen Arbeitgeber, Dr. med. vet. Heinrich Lüttgenau, der mir viel Zeit für die wissenschaftliche Arbeit einräumte.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner danke ich besonders für die freundliche Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5431-8



9 783835 195431



© Olga Gabai - Fotolia.com